



Flávia Alexandra Estevam Semedo
Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

Remoção de 17 α -Ethinilestradiol de uma Água Residual Urbana Tratada através da adição de Ácido Peracético

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa,
Professora Auxiliar, FCT- NOVA
Co-orientador: Professor Doutor João Paulo da Costa de
Noronha, Professor Auxiliar, FCT – NOVA

Presidente: Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano
Arguente(s): Prof. Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz
Vogal(ais): Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2018



Flávia Alexandra Estevam Semedo
Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

Remoção de 17 α -Ethinilestradiol de uma Água Residual Urbana Tratada através da adição de Ácido Peracético

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa,
Professora Auxiliar, FCT- NOVA
Co-orientador: Professor Doutor João Paulo da Costa de
Noronha, Professor Auxiliar, FCT - NOVA

Presidente: Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano
Arguente(s): Prof. Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz
Vogal(ais): Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2018

Remoção de 17 α -Ethinilestradiol de uma Água Residual Tratada com adição do Ácido Peracético.

Copyright © em nome de Flávia Alexandra Estevam Semedo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Rita Maurício, por me ter aceite neste projeto e pelo apoio, disponibilidade, confiança e conhecimentos transmitidos, assim como pelos conselhos dados nos momentos mais críticos.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor João Paulo Noronha, pela disponibilidade e prontidão a ajudar e por todos os conceitos laboratoriais e químicos explicados.

Ao professor Doutor Mário Diniz, pelos ensinamentos na área da ecotoxicologia, pela paciência e tranquilidade demonstradas em laboratório e pelas oportunidades e desafios propostos.

À D.Luísa e à D.Adélia, pela companhia diária ao longo de vários meses, pelos conselhos e ensinamentos transmitidos, assim como pela partilha de valores e momentos que trarei sempre comigo.

À Doutora Helena Muelle pela disponibilidade e ajuda prestada quando surgiam dúvidas laboratoriais.

À Valormed e ao Cense pelo interesse e financiamento do projeto que permitiu desenvolver esta dissertação.

À Joana, colega de todos os dias, pela amizade e companheirismo criados; pela partilha de momentos, sorrisos e até lágrimas, que fortaleceram a ligação que trazíamos de etapas académicas anteriores. Por nunca deixarmos, no final do dia, que o trabalho se sobrepusesse à nossa amizade e pela ajuda e força transmitidas no decorrer desta etapa. Obrigada!

Aos meus amigos, André, Daniel, Diogo, Fábio e Miguel, pela amizade que cresceu ao longo destes anos, pelos objetivos atingidos em conjunto e por aturarem o meu “mau feitio”.

Ao Francisco, à Martinha e ao Coelho pela amizade e pela ajuda nesta etapa da minha vida, sem vocês não seria igual.

À Raquel, ao Jorge e João pela amizade, incentivo, paciência e oportunidades dadas, e por nunca deixarem morrer a paixão pelo mundo artístico. Quem dança é muito mais feliz!

À minha família, principalmente aos meus pais, pelos valores transmitidos e pelos esforços realizados para alcançar aquilo que hoje sou e por todo o apoio em todas as minhas decisões e diferentes etapas da minha vida e, também, à minha irmã, pela parvoíce e companheirismo de sempre.

Resumo

O EE2 é uma hormona sintética utilizada na produção de contraceptivos orais femininos e é uma das principais substâncias que contribuem para a atividade estrogénica detetada em águas residuais e consequentemente principal origem de EE2 em águas superficiais.

Uma vez que os sistemas convencionais de tratamento de água residual não foram dimensionados para remover este tipo de compostos, a comunidade científica tem procurado alternativas de tratamento e, ou tratamentos complementares para evitar que estas substâncias sejam descarregadas no ambiente, nomeadamente a adoção de tratamentos terciários. Os sistemas de tratamento onde as eficiências de remoção destes compostos são maiores incluem tratamentos multi-barreira (incluindo a adoção de membranas) e oxidações avançadas, nomeadamente a adição de cloro, ozono e fenton.

Apesar das eficientes remoções de EE2 verificadas com oxidantes, nomeadamente com o cloro, e embora, em Portugal, seja um dos compostos mais utilizados na etapa de desinfecção de água residual, esta adoção poderá não ser segura devido à possível formação de trihalometanos (compostos cancerígenos), aquando da adição de cloro na presença de matéria orgânica.

Assim, este trabalho pretendeu estudar a adição de um oxidante diferente que, não sendo comum a sua utilização em água residual, existem estudos que demonstraram a sua capacidade de remoção do potencial estrogénico de uma água residual - Ácido Peracético (PAA).

Foram, desta forma, realizados ensaios onde se testaram diferentes tempos de contacto e diferentes concentrações de PAA - 10, 15 e 20 minutos e 1, 5, 10 e 15 mg.L⁻¹.

As eficiências de remoção de EE2 obtidas variaram entre 0% e 100%, dependendo das dosagens de PAA e tempo de contacto utilizados. Os ensaios que apresentaram 100% de remoção, ocorreram com concentrações de PAA de 10 mg.L⁻¹ e de 15 mg.L⁻¹, para os tempos de contacto de 10 e 15 min, respetivamente.

Complementarmente, a toxicidade do EE2 foi avaliada através de ensaios biológicos usando o peixe zebra (*Danio rerio*) como modelo biológico e determinando alguns biomarcadores de toxicidade (enzimas antioxidantes) e de desregulação endócrina (vitelogenina). Os resultados mostraram que entre os animais expostos ao EE2 e os animais expostos ao EE2+PAA não existiram diferenças significativas ao nível das enzimas antioxidantes (glutathione-S-transferase e catalase). Relativamente à análise dos níveis de vitelogenina, os resultados mostraram que quando se adicionou o PAA (EE2+PAA) ocorreu uma clara redução da estrogénicidade mostrando, por isso, a possível viabilidade do uso deste composto para remoção do EE2.

Palavras-chave: Compostos Desreguladores Endócrinos; Hormona; 17 α -Ethinilestradiol; Oxidação; Ácido Peracético; Ensaios Ecotoxicológicos

Abstract

EE2 compound it's a synthetic hormone used in the production of female oral contraceptive and is the one of the principal compounds which contribute to the estrogenic activity detected in wastewater effluents and consequently, main source of EE2 in superficial waters.

Since the conventional wastewater treatment systems aren't designed to remove these type of compounds, the scientific community has been searching for treatment alternatives, and, or complementary treatments to avoid the discharge of these substances into the environment, namely the adoption of a tertiary treatment. The treatment systems where the removal efficiencies of these compounds are major include multiple-barrier treatments (including membrane adoption) and advanced oxidation, namely chlorine addition, ozone and fenton.

Despite of EE2 high removal rates with the use of oxidants, namely chlorine and although in Portugal being one of the most used compounds in wastewater disinfection, this adoption might not be safe due to the possibility of trihalomethanes formation (carcinogenic compounds) – compounds that occur in the chlorination process in organic matter presence.

Thereby this thesis main goal consisted in a study of a different oxidant whose utilization is not common, in wastewaters disinfection process, but there have been recent studies that demonstrated its estrogenic potential removal ability – Peracetic Acid (PAA).

Therefore, with the objective of testing the PAA for the removal of the EE2, Jar-test assays were performed in which different contact times (10, 15 and 20 minutes) and different PAA concentrations (1, 5, 10 and 15 mg.L⁻¹) were used.

The removal efficiencies of the EE2 obtained varied between 0% and 100%, depending on the PAA dosages and contact times used. The assays that showed 100% removal, occurred with PAA concentrations of 10 mg.L⁻¹ and 15 mg.L⁻¹, for contact times of 10 and 15 minutes, respectively.

Additionally, the EE2 toxicity was assessed through bioassays using zebrafish (*Danio rerio*) as a biological model and determined some toxicity biomarkers (antioxidants enzymes) and the endocrine dysregulation (vitellogenin). The results showed that the differences between animals exposed to EE2 and the animals exposed to EE2+PAA there weren't significant at the antioxidants enzymes level (glutathione-s-transferase and catalase). Regarding to the analysis of the vitellogenin levels, the results suggested that when PAA was added (EE2+PAA) an evident estrogenicity reduction occurred, demonstrating the feasibility of the use of this compound in order to remove EE2.

Keywords: Endocrine Disruptors Compounds, Hormone, 17 α -Ethinylestradiol, Oxidation, Peracetic Acid, Ecotoxicologic assays

Símbolos e Abreviaturas

AR	Água Residual
BSA	Albumina Bovina
CAT	Catalase
CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio
CDNB	1 -Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CH ₃ OH	Metanol
CQO	Carência Química de Oxigênio
DAD	Deteção por Fotodíodos (Diode-Array Detection)
DMSO	Dimetilsulfóxido
E2	17β-Estradiol
EDC	Compostos Desreguladores Endócrinos
EE2	17α-Etinilestradiol
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
FLD	Fluorescência
GC	Cromatografia Gasosa
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona-S-Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCOOH	Ácido Fórmico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução (High Performance Liquid Chromatography)
K _{ow}	Coefficiente de partição octanol-água
LC	Cromatografia Líquida
LLE	Extração Líquido-Líquido (Liquid-Liquid Extraction)
LOD	Limite de Deteção
Log K _{ow}	Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água
LOQ	Limite de Quantificação
LPME	Microextração em Fase Líquida (Liquid-phase Microextraction)
LPO	Peroxidação Lipídica
MDA	Malonaldeído ou malondialdeído
Mix	Mistura Reacional
MS	Espectrometria de massa (Mass Spectrometry)
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde

PAA	Ácido Peracético
PDMS	Polidimetilsiloxano
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (Reactive Oxygen Species)
SBSE	Extração Sortiva em Barra de Agitação (Stir Bar Sorptive Extraction)
SLM	Extração em Membrana Líquida Suportada (Supported Liquid Membrane)
SPE	Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction)
SPME	Microextração em Fase Sólida (Solid-phase Microextraction)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Species
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VTG	Vitelogenina

Índice

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	3
3.	Estrutura da Dissertação	5
4.	Revisão Bibliográfica	7
4.1.	Água Residual	7
4.2.	Desreguladores Endócrinos	10
4.2.1.	<i>Definição</i>	10
4.2.2.	<i>Características e classificação</i>	11
4.2.3.	<i>Fontes de contaminação</i>	12
4.2.4.	<i>Sistema endócrino</i>	13
4.2.5.	<i>Desregulação Endócrina</i>	15
4.2.6.	<i>Efeitos no ambiente e seres vivos</i>	16
4.3.	17 α -Ethinilestradiol	19
4.3.1.	<i>Propriedades físico-químicas</i>	19
4.3.2.	<i>Aplicações e Fontes de EE2</i>	21
4.3.3.	<i>Presença no ambiente</i>	23
4.3.4.	<i>Impactes e principais efeitos</i>	25
4.3.5.	<i>Remoção de EE2 em ETAR</i>	27
4.4.	Legislação	29
4.5.	Desinfecção de Águas Residuais Tratadas	31
4.5.1.	<i>Importância da desinfecção</i>	31
4.5.2.	<i>Tratamentos convencionais</i>	33
4.5.3.	<i>Ácido peracético</i>	36
4.6.	Métodos analíticos para a determinação de EDC	43
4.6.1.	<i>Método de extração: SBSE</i>	43
4.6.2.	<i>Método de deteção: HPLC-DAD</i>	45
4.7.	Bioensaio	48
5.	Plano Experimental	51
6.	Materiais e Métodos	55
6.1.	Materiais	55

6.1.1.	<i>Água Residual Urbana – Caso de estudo</i>	55
6.1.2.	<i>Material Utilizado</i>	56
6.1.3.	<i>Reagentes</i>	57
6.2.	<i>Métodos</i>	58
6.2.1.	<i>Solução Padrão de 17α-Ethinilestradiol</i>	58
6.2.2.	<i>Preparação de brancos</i>	58
6.2.3.	<i>Curva de Calibração recorrendo ao método SBSE</i>	59
6.2.4.	<i>Jar-test: ensaios com adição de PAA</i>	60
6.2.5.	<i>Solução diluída de PAA</i>	61
6.2.6.	<i>Procedimento laboratorial adotado</i>	63
6.2.7.	<i>Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)</i>	65
6.2.8.	<i>Método de quantificação do composto EE2</i>	66
6.2.9.	<i>Contribuição do PAA para a Carência Química do Oxigênio</i>	66
6.2.10.	<i>Interferência do PAA com o pH</i>	67
6.2.11.	<i>Ensaio Ecotoxicológicos: ensaios in vivo</i>	67
7.	<i>Resultados e Discussão</i>	75
7.1.	<i>Branco analisado</i>	75
7.2.	<i>Curvas de Calibração utilizadas nos ensaios, LOD e LOQ</i>	78
7.3.	<i>Ensaio de remoção com PAA</i>	79
7.4.	<i>Influência do PAA nas propriedades físico-químicas da AR</i>	83
7.5.	<i>Ensaio ecotoxicológicos</i>	84
8.	<i>Conclusões</i>	91
9.	<i>Desenvolvimentos futuros</i>	93
10.	<i>Bibliografia</i>	95
	<i>Anexos</i>	109

Índice de Anexos

Anexo I - Poster elaborado para o 16º Encontro Nacional de Ecologia	110
Anexo II - Certificado de participação no 16º Encontro Nacional de Ecologia	111
Anexo III – Submissão de um poster à ISDRS 2018.	112
Anexo IV - Ficha de Segurança do composto EE2.....	113
Anexo V - Ficha de Segurança do Ácido Peracético	120
Anexo VI - Determinação da Carência Química de Oxigênio (CQO)	135
Anexo VII - Protocolo do Ensaio da Proteína Bradford.....	137
Anexo VIII - Curva de calibração (250 mL) e cromatogramas.....	138
Anexo IX - Ensaios ecotoxicológicos: tabelas de resultados GST	140
Anexo X - Ensaios ecotoxicológicos: tabelas de resultados Catalase.....	141
Anexo XI - Ensaios ecotoxicológicos: tabelas de resultados VTG	142
Anexo XII - Ensaios ecotoxicológicos: tabelas de resultados Peroxidação Lipídica	143

Índice de Figuras

Figura 1 - Exemplos da estrutura molecular de alguns EDC.....	12
Figura 2 - Diagrama com as maiores glândulas do sistema endócrino humano, feminino (esquerda) e masculino (direita)..	14
Figura 3 - Processo de desregulação endócrina..	15
Figura 4 - Efeitos dos EDC na saúde humana.....	17
Figura 5 - Estrutura química do 17 α -Ethinilestradiol.....	19
Figura 6 - Fontes e mecanismos de contaminação dos estrogénios esteroídicos..	22
Figura 7 - Modelo desenvolvido por Johnson e Williams, em 2004.....	23
Figura 8 - Processos de desinfeção: Físicos, Químicos e Naturais..	34
Figura 9 - Barra de agitação utilizada na extração com SBSE/PDMS.	44
Figura 10 - Componentes básicos de um equipamento HPLC.....	47
Figura 11 - Cronograma do trabalho experimental desenvolvido.	52
Figura 12 - Representação esquemática da ETAR da Quinta do Conde.....	56
Figura 13 - Esquema representativo da preparação dos padrões da curva de calibração.	59
Figura 14 - Esquema representativo da preparação das curvas de calibração de 1 L.	60
Figura 15 - Esquema representativo da solução diluída de PAA preparada.	62
Figura 16 - Esquema representativo do procedimento de extração com SBSE descrito no ponto 6.2.5.....	64
Figura 17 - Ensaio de exposição do D. rerio ao EE2 e ao PAA.....	68
Figura 18 - Procedimento experimental adoptado nos bioensaios.....	69
Figura 19 - Procedimento experimental da Peroxidação lipídica.....	73
Figura 20 - Cromatograma referente à amostra com água desmneralizada e com 100 ppb de EE2 (λ =281 nm).....	75
Figura 21 - Cromatograma referente à amostra de água desmineralizada com PAA, com uma dose aplicada de 15 mg.L ⁻¹ e 20 minutos de tempo de contacto (λ =281 nm).	76
Figura 22 - Cromatograma referente à amostra de água residual (λ =281 nm).	76
Figura 23 - Cromatograma referente à amostra de água residual e 50 ppb de EE2 (λ =281 nm). ..	77
Figura 24 - Cromatograma referente à amostra de água residual e PAA, com uma dose de 15 mg.L ⁻¹ e 20 minutos de tempo de contacto (λ =281 nm).	77
Figura 25 - Curva de calibração de EE2 utilizada ao longo dos ensaios (1 L).	78
Figura 26 - Eficiências de remoção de EE2 com a adição de PAA no ensaio 1 (TC=10 minutos). 79	

Figura 27 - Eficiências de remoção de EE2 com a adição de PAA no ensaio 2 (TC=15 minutos).	80
Figura 28 - Eficiências de remoção de EE2 com a adição de PAA no ensaio 3 (TC=20 minutos).	81
Figura 29 - Eficiências de remoção de EE2 com adição de PAA.	82
Figura 30 - Glutathione-s-transferase (GST) obtida em cada um dos grupos de ensaio.	85
Figura 31 - Catalase (CAT) obtida em cada um dos grupos de ensaio.	86
Figura 32 - Vitelogenina (VTG) obtida em cada um dos grupos de ensaio.	87
Figura 33 - Peroxidação lipídica (LPO) obtida em cada um dos grupos de ensaio.	88
Figura 34 - Curva de calibração concentrando 250 mL.	138
Figura 35 - Cromatograma referente à curva de calibração concentrando 250 mL ($\lambda=281$ nm)...	138
Figura 36 - Cromatograma referente à curva de calibração concentrando 1 L ($\lambda=281$ nm).....	139

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais componentes de preocupação no tratamento de águas residuais.	8
Tabela 2 - Requisitos para descargas de águas residuais urbanas.	9
Tabela 3 - Níveis de tratamento da água residual urbana.	10
Tabela 4 - Fontes pontuais e difusas de contaminação de EDC.	13
Tabela 5 - Efeitos dos EDC na vida selvagem.	18
Tabela 6 - Propriedades físico-químicas do 17 α -Ethinilestradiol.	20
Tabela 7 - Ocorrência de EE2 em Portugal, concentrações medidas em diferentes matrizes e fontes.	24
Tabela 8 - Concentração de EE2 em água potável. Fonte: adaptado de Vilela et al. (2018).	24
Tabela 9 - Concentrações de EE2 em várias matrizes.	25
Tabela 10 - Sistemas de tratamento secundário com remoção do EE2.	28
Tabela 11 - Regulamentos/abordagens para estrogénios esteróides.	30
Tabela 12 - Microrganismos patogénicos possivelmente presentes em água residual não tratada.	32
Tabela 13 - Remoção do EE2 em sistemas de tratamento terciário.	35
Tabela 14 - Características físico-químicas do PAA.	37
Tabela 15 - Vantagens e desvantagens da utilização do PAA.	42
Tabela 16 - Vantagens da técnica SBSE.	45
Tabela 17 - Plano experimental detalhado.	51
Tabela 18 - Resumo do procedimento experimental adotado para os ensaios com PAA.	52
Tabela 19 - Procedimento experimental adotado para os ensaios biológicos com peixe zebra (Danio rerio).	53
Tabela 20 - Características da Água Residual Urbana utilizada durante os ensaios laboratoriais.	56
Tabela 21 - Ensaios em branco realizados e respectivos objetivos.	58
Tabela 22 - Condições de tratamento para cada ensaio.	61
Tabela 23 - Volume de solução de PAA a adicionar nos ensaios.	63
Tabela 24 - Contribuição teórica do PAA para a CQO.	67
Tabela 25 - Preparação dos Padrões de Formaldeído.	70
Tabela 26 - Padrões de MDA: concentrações e respetivos volumes de solução mãe.	73
Tabela 27 - Limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do EE2.	78
Tabela 28 - CQO, antes e após a adição de PAA, de uma solução padrão e água residual.	83
Tabela 29 - Contribuição do PAA para a CQO segundo diferentes autores.	83
Tabela 30 - Valores de pH da água residual após a adição de 1, 5, 10 e 15 mg.L ⁻¹	84

Tabela 31 - Padrões BSA.....	137
Tabela 32 - Teste estatístico do t-student para o GST.	140
Tabela 33 - Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para o GST.....	140
Tabela 34 - Teste estatístico do t-student para a CAT.	141
Tabela 35 - Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para a CAT.....	141
Tabela 36 - Teste estatístico do t-student para a VTG.	142
Tabela 37 - Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para a VTG.....	142
Tabela 38 - Teste estatístico do t-student para a LPO.	143
Tabela 39 - Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para a LPO.....	143

1. Introdução

Os Compostos Desreguladores Endócrinos (EDC) são maioritariamente compostos de origem antropogénica (Barbosa *et al.*, 2016; Noutsopoulos *et al.*, 2013) e caracterizam-se pela sua capacidade de interferir com o sistema endócrino dos seres vivos promovendo alterações no funcionamento do organismo e provocando efeitos adversos na saúde dos organismos expostos a estes químicos (Kabir *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, devido às características químicas e tóxicas que os EDC apresentam, a preocupação com os efeitos ambientais e consequências na saúde pública têm vindo a crescer, levando à criação de uma lista de vigilância de poluentes aquáticos emergentes pela EU, onde se inclui o 17 α -Ethinilestradiol (EE2) (Barreiros *et al.*, 2016; Prasse *et al.*, 2015).

O EE2 é um estrogénio oral bioativo amplamente utilizado como pílula contraceptiva (Crawford *et al.*, 2017; D. Liu *et al.*, 2017; Ting e Praveena, 2017) em que, de acordo com Adeel *et al.* (2017), os cerca de 7 mil milhões de habitantes mundiais, descarregam para o ambiente cerca de 700 kg/ano de EE2, verificando-se que se apresenta como um dos EDC com maior potencial estrogénico e comum nos efluentes de águas residuais (Plahuta *et al.*, 2017).

Os efluentes de ETAR são reportados como sendo a maior fonte de estrogénios nos ambientes aquáticos (Plahuta *et al.*, 2017), uma vez que esta hormona não é completamente removida nas estações de tratamento convencionais de água residual, dispersando-se no ambiente após serem descarregados (Vilela *et al.*, 2018) e consequentemente, podendo contaminar a água de abastecimento para consumo humano (Barbosa *et al.*, 2016).

Assim, a presença deste composto tornou-se um problema generalizado devido, não só, ao seu elevado potencial estrogénico e potencial tóxico mesmo em baixas concentrações (Dan Liu *et al.*, 2017; Vilela *et al.*, 2018), como também à sua elevada resistência ao processo de degradação (Aris *et al.*, 2014).

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da adição de ácido peracético na remoção de 17 α -Ethinilestradiol de águas residuais urbanas tratadas.

Pretendeu-se avaliar a influência do tempo de contacto e dosagem de ácido peracético nas eficiências de remoção do EE2, bem como avaliar a possível toxicidade provocada após a adição deste desinfetante.

3. Estrutura da Dissertação

A dissertação encontra-se dividida em 10 capítulos e 12 anexos, sendo que toda a informação apresentada se baseia em artigos publicados, em fase de publicação e/ou aceitação, e em dissertações de Mestrado e teses de Doutoramento.

No primeiro capítulo expôs-se a problemática que serviu de base ao presente trabalho. No segundo capítulo foram descritos os principais objetivos da presente dissertação.

O quarto capítulo apresentou o enquadramento e conhecimento teóricos que suportam o trabalho desenvolvido para este estudo. No quinto capítulo é demonstrado o plano experimental adotado durante o trabalho laboratorial, nomeadamente as diferentes etapas e fases desenvolvidas.

No sexto capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados para o estudo da remoção do EE2. No capítulo sétimo, são apresentados os resultados obtidos e a respetiva discussão dos resultados.

As conclusões referentes ao trabalho efetuado encontram-se no capítulo oitavo, e por último, no nono capítulo é possível ler quais os desenvolvimentos futuros relativos a esta matéria e quais os próximos passos a explorar.

Os anexos apresentados pretenderam servir de apoio e suporte a toda a informação apresentada ao longo dos diferentes capítulos. O Anexo I é referente a um poster elaborado no âmbito desta dissertação e apresentado no *16º Encontro Nacional de Ecologia*, na FCUL e respetivo certificado de participação (Anexo II).

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Água Residual

A água residual define-se como a combinação de resíduos líquidos ou de água proveniente de residências, instituições, estabelecimentos comerciais e/ou industriais, e ainda infiltrações de águas subterrâneas, superficiais e/ou pluviais (Metcalf & Eddy, 2003).

A legislação portuguesa define os vários tipos de água residual, (segundo o *Decreto-Lei nº. 152/97*, de 19 de Junho), como:

- “Águas Residuais Domésticas”: as águas residuais de serviços e de instalações residenciais, essencialmente provenientes do metabolismo humano e de atividades domésticas;
- “Águas Residuais Industriais”: as águas residuais provenientes de qualquer tipo de atividade que não possam ser classificadas como águas residuais domésticas nem sejam águas pluviais;
- “Águas Residuais Urbanas”: as águas residuais domésticas ou a mistura destas com águas residuais industriais e/ou com águas pluviais.

As substâncias presentes nas águas residuais são uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas, suspensas ou dissolvidas, nomeadamente sólidos (suspensos: fezes, trapos, papel, etc., e coloidais), nutrientes, uma grande variedade de produtos químicos, e microrganismos patogénicos (Mara, 2003; Metcalf & Eddy, 2003).

As principais preocupações referentes a cada uma destas componentes mostram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais componentes de preocupação no tratamento de águas residuais. Fonte: (Metcalf & Eddy, 2003).

Constituinte	Efeitos
Sólidos Suspensos	Os sólidos suspensos podem provocar o desenvolvimento de depósitos de lama e condições anaeróbias quando as AR brutas são descarregadas em ambientes aquáticos.
Orgânicos biodegradáveis (biodegradable organics)	Compostos principalmente por proteínas, hidratos de carbono e gorduras, os compostos orgânicos biodegradáveis são medidos, normalmente em termos de CBO e CQO. Se for descarregada AR bruta, a sua estabilização biológica pode levar à depleção de oxigénio dos meios naturais.
Patogénicos	Podem ser transmitidas doenças por organismos patogénicos que se encontrem presentes em AR.
Nutrientes	O fósforo, o azoto e o carbono, são elementos essenciais à vida. Contudo, quando descarregados em excesso para ambientes aquáticos, podem levar ao crescimento de vida aquática indesejável e, por exemplo, a fenómenos de eutrofização. Quando descarregados no solo, em quantidades excessivas, podem provocar, por exemplo, poluição em águas subterrâneas.
Poluentes Prioritários	Compostos orgânicos e inorgânicos selecionados com base nas características, conhecidas ou suspeitas, carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas ou de toxicidade aguda alta. Muitos destes compostos são encontrados em AR.
Orgânicos refratários (refractory organics)	Estes compostos tendem a persistir mesmo após o tratamento convencional de água residual.
Metais pesados	Os metais pesados chegam normalmente à AR por via de atividades comerciais e industriais.
Inorgânicos dissolvidos (Dissolved inorganics)	Constituintes inorgânicos como o cálcio, o sódio e o sulfato são adicionados durante o tratamento de água para abastecimento público, ou porque fazem parte dos constituintes do solo onde a água é captada, e dessa forma, chegam mais tarde à AR.

Torna-se assim relevante proceder à caracterização qualitativa e quantitativa do efluente, obtendo-se conhecimentos dos componentes de interesse presentes na água residual, quais os seus impactes para a saúde pública e ambiente e quais os sistemas de tratamento passíveis de serem aplicados respeitando os requisitos de qualidade dos efluentes (Mara, 2003; Metcalf & Eddy, 2003).

O tratamento exigido antes da descarga da água residual para o ambiente tem como objetivo obter um efluente de qualidade que permite (Degremont, 1991; Leite, 2014; Mara, 2003):

- Prevenir e reduzir a transmissão de doenças relacionadas com microrganismos patogénicos presentes nas excreções;
- Prevenir situações incómodas e indesejáveis no local de descarga (cheiros, insetos, ...);
- Proteção das águas e biota aquático, através da redução da contaminação e poluição das águas e manutenção da qualidade de água;

- Conservação da quantidade e qualidade da água para usos balneares e recreativos e para usos futuros;
- Produção de um efluente adequado para fins específicos, nomeadamente reutilização agrícola e/ou aquacultura, entre outros.

De modo a atingir os objetivos preconizados, as autoridades encarregues de gestão da água, estabelecem regulamentos onde se especificam os requisitos de qualidade de efluentes através de níveis de descarga para determinados parâmetros (Degremont, 1991; Mara, 2003).

O *Decreto-Lei n.º 152/97*, de 19 de Junho, define os requisitos necessários para a descarga de um efluente de ETAR após o tratamento secundário e descarga em zonas sensíveis sujeitas à eutrofização. Na Tabela 2 são apresentados sucintamente os requisitos exigidos.

Tabela 2 - Requisitos para descargas de águas residuais urbanas. Fonte: (Decreto-Lei n.º 152/97, 19 de Junho).

Parâmetro	Concentração	Percentagem mínima de redução
CBO₅ a 20 °C sem nitrificação	25 mg.L ⁻¹ O ₂	70 – 90
CQO	125 mg.L ⁻¹ O ₂	75
Fósforo Total	2 mg.L ⁻¹ P ¹	80
	1 mg.L ⁻¹ P ²	
Azoto Total	15 mg.L ⁻¹ N ¹	70 – 80
	10 mg.L ⁻¹ N ²	

¹ 10 000 -100 000 e.p.; ² mais de 100 000 e.p.

A descarga de águas residuais urbanas não tratadas ou insuficientemente tratadas, pode contribuir para o consumo de oxigénio dissolvido, originando processos de eutrofização e servir de veículo à proliferação de vetores e à transmissão de doenças patogénicas (Leite, 2014; Mara, 2003; Saraiva, 2015).

O nível de tratamento exigido para tratamento de águas residuais urbanas depende das características do afluente à ETAR e da qualidade exigida para o efluente (Qasim, 1994). Assim, os tratamentos do afluente incluem operações unitárias (onde predomina a aplicação de forças físicas) e processos unitários (métodos baseados em reações químicas ou biológicas) (Metcalf & Eddy, 2003).

Na Tabela 3 são resumidos os diferentes níveis de tratamento de água residual urbana e o respetivo objetivo.

Tabela 3 - Níveis de tratamento da água residual urbana. Fonte: adaptado de Metcalf & Eddy (2003)

Nível de Tratamento	Descrição
Preliminar	Remoção de resíduos da AR nomeadamente, vegetação, areias, sólidos flutuantes, e gorduras que possam causar problemas operacionais ou de manutenção no processo e sistemas de tratamento.
Primário	Remoção de sólidos suspensos e da matéria orgânica da AR associada a estes sólidos.
Primário Avançado	Remoção significativa dos sólidos suspensos e da matéria orgânica da AR associada a estes sólidos. Inclui, tipicamente, a adição de químicos ou uma etapa de filtração.
Secundário	Remoção de matéria orgânica biodegradável (em solução ou suspensão) e de sólidos suspensos, através de processos biológicos.
Secundário com remoção de nutrientes	Remoção de matéria orgânica biodegradável, sólidos suspensos e nutrientes (azoto, fósforo ou ambos), normalmente através de processos biológicos e, ou químicos.
Terciário	Remoção de sólidos suspensos (após o tratamento secundário), normalmente por filtração ou tamisação, e ainda desinfecção.
Avançado	Remoção de matéria dissolvida ou suspensa que permanece após o tratamento biológico convencional quando é necessária a reutilização da água para fins específicos.

O local de descarga e os usos a que o efluente é destinado estabelecem as concentrações impostas aos vários parâmetros e o nível de tratamento de uma água residual (Qasim, 1994).

4.2. Desreguladores Endócrinos

4.2.1. Definição

Um grande número de substâncias químicas antropogénicas de reconhecida toxicidade, são libertadas para o ambiente, algumas das quais passíveis de interferir com o normal funcionamento do sistema endócrino dos organismos vivos expostos, sendo por isso denominados de Compostos Desreguladores Endócrinos (EDC) (Fernandes, 2012; Plahuta *et al.*, 2017; Ting e Praveena, 2017).

Existem diversas definições propostas por diferentes entidades e organizações mundiais para EDC, no entanto, a característica comum a todas elas é o efeito nocivo que estes compostos têm na saúde dos seres vivos, nomeadamente sobre o seu sistema endócrino (Hong, 2012; Patisaul e Belcher, 2017).

Em 1996, a “Agência de Proteção Ambiental dos EUA” (US EPA) definiu EDC como agentes exógenos que interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormonas naturais responsáveis pela manutenção da homeostasia, reprodução e processos de desenvolvimento e comportamento nos seres vivos (Kabir *et al.*, 2015; Dan Liu *et al.*, 2017; Nollet e Lambropoulou, 2017; Patisaul e Belcher, 2017).

De acordo, com a definição proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2002, um EDC “é uma substância ou mistura de substâncias exógenas que alteram as funções do sistema endócrino e consequentemente causa(m) efeitos adversos para a saúde de um organismo ou da sua descendência ou (sub) populações” (Boshir *et al.*, 2017; Hong, 2012; Mallozzi *et al.*, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013).

A OMS definiu ainda que, “uma substância ou mistura de substâncias exógenas que possuem propriedades que se espera que possam conduzir à disrupção endócrina de um organismo ou da sua descendência e ou (sub) populações” é considerado um Potencial Disruptor Endócrino (PED) (Patisaul e Belcher, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013).

Mais recentemente, em 2012, a Sociedade Endócrina definiu EDC como substâncias químicas ou misturas que imitam, bloqueiam ou interferem com a ação das hormonas do sistema endócrino (Gore *et al.*, 2014; Patisaul e Belcher, 2017).

Assim, EDC são considerados substâncias químicas ou misturas destas que conseguem alterar as funções biológicas dos seres vivos através da desregulação do sistema endócrino (Windsor *et al.*, 2017) representando uma ameaça para os seres vivos e biodiversidade, uma vez que podem causar efeitos adversos na saúde humana e na saúde selvagem (Boshir *et al.*, 2017; Nollet e Lambropoulou, 2017; Patisaul e Belcher, 2017).

4.2.2. Características e classificação

Os EDC são compostos emergentes, bioativos e com atividade principalmente estrogénica (Crawford *et al.*, 2017; Mallozzi *et al.*, 2017). Normalmente, são referidos como imitadores de hormonas, uma vez que o organismo é incapaz de detetar a diferença entre a hormona natural e os EDC devido à semelhança de características existentes entre ambos (Crawford *et al.*, 2017; Kabir *et al.*, 2015).

Estes compostos apresentam propriedades físicas e químicas distintas (Soeiro e Ferreira, 2013; Wee e Aris, 2017), no entanto, na sua globalidade os desreguladores endócrinos são lipofílicos, não polares, hidrofóbicos e semi-voláteis, apresentando também características de recalcitrância, o que facilita a sua distribuição, dispersão e bioacumulação no ambiente, principalmente no ambiente aquático (Fernandes, 2012; Nollet e Lambropoulou, 2017; Wee e Aris, 2017; Windsor *et al.*, 2017).

Os EDC apresentam algumas características estruturais que são indicativas do seu efeito sobre o sistema endócrino, nomeadamente a presença de um anel fenólico sem halogénios, grupos funcionais de sulfonas, substituição do cloro e do bromo ao lado do grupo OH no anel fenólico; como se mostra nas várias moléculas da Figura 1. No entanto, não é possível determinar se um composto é um EDC considerando apenas a sua estrutura molecular (Kabir *et al.*, 2015).

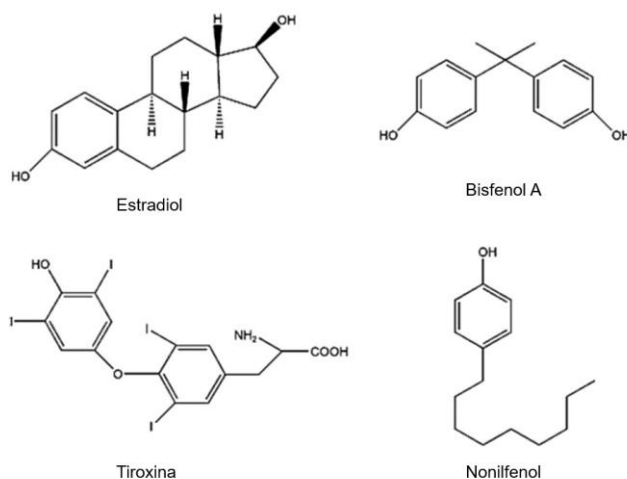


Figura 1 - Exemplos da estrutura molecular de alguns EDC. Fonte: (Kabir *et al.*, 2015)

Os EDC são um grupo muito heterogêneo que compreende uma vasta gama de substâncias químicas; segundo a OMS, em 2012, eram conhecidos ou considerados suspeitos, cerca de 800 substâncias químicas, com capacidade para interferir com o sistema endócrino (Crawford *et al.*, 2017; Mallozzi *et al.*, 2017).

Estes compostos podem ser classificados em duas categorias, os que ocorrem naturalmente e aqueles que são sintetizados pelo homem (Kabir *et al.*, 2015; Mallozzi *et al.*, 2017; Nollet e Lambropoulou, 2017; Wee e Aris, 2017).

Os EDC naturais compreendem os estrogénios (ex.: E1, E2 e E3), androgénios (ex.: testosterona), progesterona, fitoestrogénios (ex.: genisteína e coumestrol) e alguns metais, como o chumbo e o magnésio, por exemplo (Fernandes, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Soeiro e Ferreira, 2013; Wee e Aris, 2017).

Por sua vez, os EDC sintéticos englobam alguns produtos químicos sintetizados utilizados como solventes industriais ou lubrificantes (ex.: bifenilos polibromados (PBBs), dioxinas); plásticos (ex.: bisfenol A (BPA); ftalatos), plastificantes, pesticidas (ex.: Diclorodifeniltricloroetano (DDT)); retardadores de fogo; fungicidas e alguns produtos farmacêuticos (ex.: etinilestradiol (EE2)) e de cuidados pessoais (ex.: dietilstilbestrol (DES)) (Crawford *et al.*, 2017; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Mallozzi *et al.*, 2017; Wee e Aris, 2017).

4.2.3. Fontes de contaminação

Os EDC encontram-se presentes em muitos produtos utilizados na vida diária dos seres humanos, estando continuamente a ser introduzidos no meio aquático, no ar e no solo (Kabir *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Patisaul e Belcher, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013).

São exemplos desses produtos os plásticos, detergentes e desinfetantes, materiais de construção, produtos químicos industriais, electrodomésticos, móveis, têxteis e vestuário, produtos infantis, utensílios de cozinha e recipientes para alimentos, em produtos agrícolas e de jardinagem (pesticidas, herbicidas e fungicidas), produtos farmacêuticos (por ex.: contraceptivos hormonais e antibióticos),

cosméticos e produtos de cuidados pessoais, protectores solares e alguns produtos alimentares (como as leguminosas e o vinho tinto) (Council, 2010; Crawford *et al.*, 2017; Gore *et al.*, 2014; Kabir *et al.*, 2015; Patisaul e Belcher, 2017; Wee e Aris, 2017).

Estes compostos, provenientes maioritariamente de actividades antropogénicas (Nollet e Lambropoulou, 2017), como a agricultura e pecuária, a indústria (alimentar e farmacêutica, por exemplo) e a construção (Kabir *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017), são introduzidos no ambiente através de fontes pontuais e difusas (Tabela 4), durante todas as fases do seu ciclo de vida (fabrico, uso e aplicação, eliminação e descarga) (Fernandes, 2012; Wee e Aris, 2017). A água residual tratada é considerada a maior fonte de EDC (Council, 2010; Fernandes, 2012; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Plahuta *et al.*, 2017).

Tabela 4 - Fontes pontuais e difusas de contaminação de EDC.

Fontes Difusas	Fontes Pontuais	Referências
Escoamento e lixiviação de campos agrícolas onde se espalham as lamas provenientes de ETAR e outros fertilizantes e de pecuária (contaminação de águas superficiais e subterrâneas)	Efluentes industriais	(Archer <i>et al.</i> , 2017; Council, 2010; Crawford <i>et al.</i> , 2017; Fernandes, 2012; Kabir <i>et al.</i> , 2015; Nollet e Lambropoulou, 2017; Patisaul & Belcher, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013; Wee e Aris, 2017)
Lixiviados provenientes de aterros e locais de eliminação de resíduos (contaminação de águas superficiais e subterrâneas)	Descargas de estações de tratamento de águas residuais	
Escoamento e lixiviação de zonas urbanizadas e residenciais	Efluentes de actividade agrícola	

Como consequência, têm sido identificados tanto em ecossistemas aquáticos (águas superficiais – rios, lagos, etc; águas subterrâneas) como em ecossistemas terrestres, a presença destes compostos, em concentrações que podem variar de alguns miligramas por litro (mg.L⁻¹) a alguns microgramas por litro (µg.L⁻¹) (Crawford *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Nollet e Lambropoulou, 2017; Wee e Aris, 2017).

4.2.4. Sistema endócrino

O sistema endócrino (Figura 2) consiste num conjunto de glândulas, que em resposta a estímulos exógenos segregam hormonas para o sistema circulatório, de modo a serem transportadas até aos órgãos e células alvo, afetando a regulação de processos de reprodução, crescimento, desenvolvimento, cognição, comportamento, metabolismo, osmose, homeostase e degeneração de vertebrados e invertebrados (Council, 2010; Crawford *et al.*, 2017; Gore *et al.*, 2014; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Patisaul e Belcher, 2017).

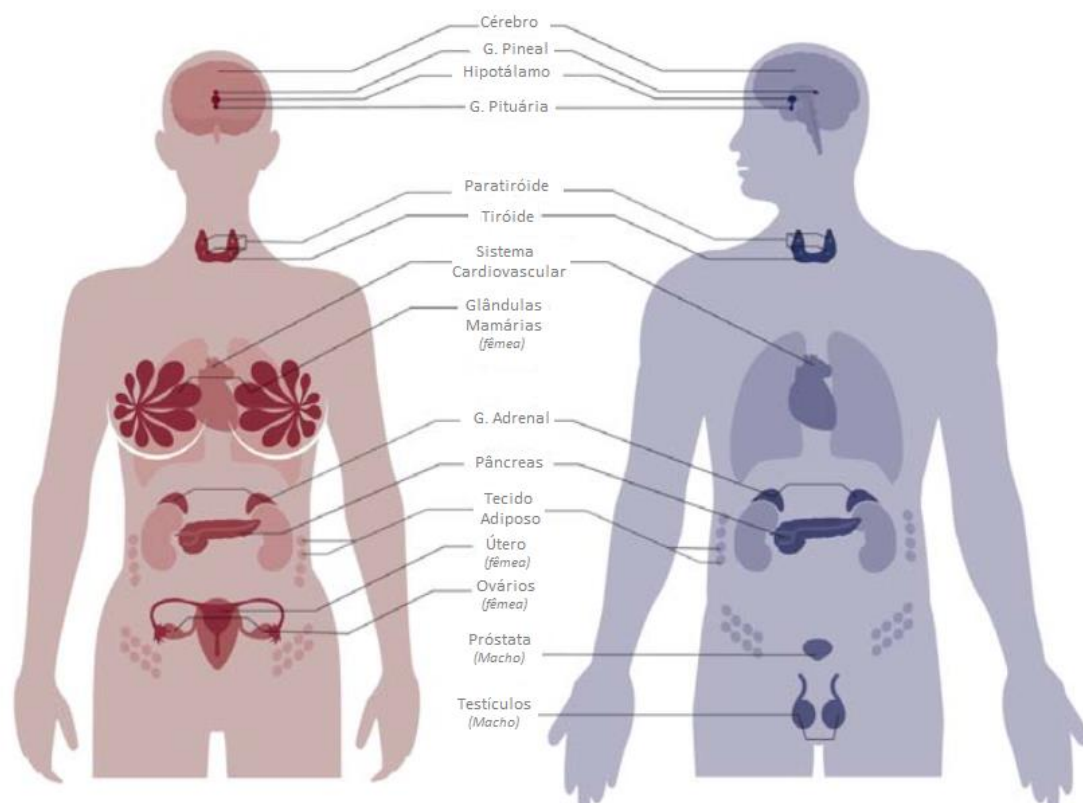


Figura 2 - Diagrama com as maiores glândulas do sistema endócrino humano, feminino (esquerda) e masculino (direita). Fonte: adaptado de Gore *et al.* (2014).

As hormonas, sintetizadas naturalmente pelo organismo, representam mensageiros químicos que regulam a comunicação entre as células, a fim de coordenar as funções de diferentes partes do corpo, provocando efeitos específicos no sistema endócrino (Council, 2010; Crawford *et al.*, 2017; Hong, 2012).

O sistema endócrino é complexo e as suas funções diversas. Cada glândula e hormona segregada desempenha um papel único na saúde dos seres vivos; existem glândulas que produzem apenas uma hormona e outras que conseguem produzir múltiplas hormonas com diferentes funções e células-alvo distintas (Gore *et al.*, 2014).

As hormonas quando chegam às células-alvo ligam-se a recetores específicos desencadeando uma resposta que pode ser traduzida numa mudança no metabolismo, numa resposta comportamental ou na produção e secreção de outra hormona (Council, 2010; Gore *et al.*, 2014; Hong, 2012; Patisaul e Belcher, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013).

Os recetores de cada célula-alvo são específicos para cada hormona, correspondendo ao princípio de que “cada chave terá uma fechadura”; contudo, a capacidade de resposta a um estímulo depende não só da presença de um recetor na célula-alvo capaz de emparelhar com a hormona segregada como da capacidade de ativação do mesmo (dependente da quantidade de hormona produzida - que atinge o recetor, do transporte através do sistema circulatório, da sua potência e do intervalo de tempo em que consegue activar o recetor) (Gore *et al.*, 2014).

Sabendo que o sistema endócrino é um dos sistemas mais importantes dos seres vivos, devido ao seu papel crítico nas mais variadas funções biológicas e fisiológicas (Hong, 2012; Patisaul e Belcher, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013), as respostas emitidas e a concentração de hormonas libertadas deve ser adequada e as glândulas endócrinas devem estar capacitadas para realizar a homeostase consoante os estímulos recebidos de modo a promover o equilíbrio do organismo (Council, 2010; Gore *et al.*, 2014; Hong, 2012).

4.2.5. Desregulação Endócrina

A desregulação endócrina ocorre quando os EDC estão presentes no organismo e interferem de alguma forma com a função das hormonas endógenas, resultando numa alteração da função endócrina e dos padrões naturais de resposta do sistema endócrino (Crawford *et al.*, 2017; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Wee e Aris, 2017).

Os EDC conseguem interromper o sistema endócrino e alterar as funções hormonais através de vários mecanismos (Figura 3), nomeadamente:

- Imitando, total ou parcialmente, as hormonas endógenas, ligando-se aos seus recetores e originando uma resposta similar à esperada, provocando, como tal um efeito agonista (Council, 2010; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Wee e Aris, 2017);
- Bloqueando os recetores ou bloqueando as hormonas naturais, impedindo que ocorra a ligação entre os recetores e as hormonas endógenas e consequentemente inibindo a resposta a um estímulo exógeno, apresentando, como tal, um efeito antagonista (Council, 2010; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Wee e Aris, 2017);
- Interferindo no metabolismo, síntese, transporte e excreção das hormonas endógenas, podendo alterar as concentrações destas hormonas (Council, 2010; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Wee e Aris, 2017);
- Perturbando a síntese ou metabolismo dos recetores hormonais, alterando os níveis de recetores hormonais (Council, 2010; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Wee e Aris, 2017).

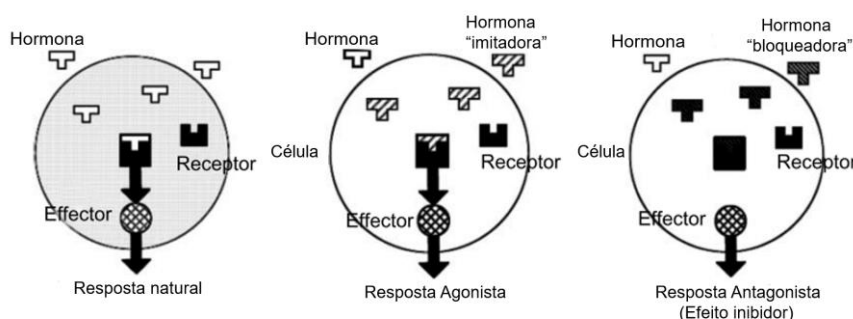


Figura 3 - Processo de desregulação endócrina. Fonte: adaptado de Rahman *et al.* (2009).

O nível de desregulação endócrina e os respetivos efeitos são muito variáveis e são influenciados por processos biológicos (Ting e Praveena, 2017), dependendo de vários fatores, mais concretamente:

- Idade de exposição: os efeitos provocados são diferentes dependendo do período de desenvolvimento de um ser vivo: pré-natal, infância, adolescência ou vida adulta. A exposição a EDC é mais perigosa durante os períodos em que o organismo se encontra mais sensível à ruptura hormonal, nomeadamente na fase pré-natal, infância ou puberdade, uma vez que são fases de rápidos eventos estruturais e funcionais (Kabir *et al.*, 2015; Mallozzi *et al.*, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013; Wee e Aris, 2017). A exposição nestes períodos pode ter consequências mais graves e irreversíveis comparativamente com a exposição na fase adulta, onde, normalmente, o efeito desaparecerá após a expulsão do EDC envolvido (Soeiro e Ferreira, 2013).
- Envolvimento de outros compostos: os poluentes encontram-se misturados no ambiente, ficando os organismos expostos a vários compostos. Os “cocktails” de EDC podem induzir efeitos aditivos ou sinérgicos, sendo que a soma da actividade de dois EDC é superior à adição das suas actividades isoladas (Kabir *et al.*, 2015; Mallozzi *et al.*, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013).
- Concentração de EDC: os EDC encontram-se em quantidades baixas no ambiente, e crê-se que doses baixas possam ter efeitos que não são preditos para doses mais elevadas, no entanto, ainda não é consensual na comunidade científica a relação dose-efeito de um EDC uma vez que esta depende da sensibilidade do organismo e muitos compostos apresentam uma relação dose-efeito não linear e não monotónica (Crawford *et al.*, 2017; Kabir *et al.*, 2015; Mallozzi *et al.*, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013).

A duração da exposição (que pode levar à transmissão dos efeitos para as gerações futuras); a latência de exposição (os efeitos manifestam-se após o período de exposição, na fase adulta por exemplo); o género (os efeitos variam consoante o género e dependendo das necessidades de cada organismo) e também a classe de EDC presente são ainda alguns dos fatores que podem definir o nível de desregulação endócrina (Kabir *et al.*, 2015; Soeiro e Ferreira, 2013; Wee e Aris, 2017).

4.2.6. Efeitos no ambiente e seres vivos

Os seres vivos entram em contacto com os EDC através de várias vias, principalmente por consumo de água contaminada e alimentos (soja, nozes, entre outros), absorção através da pele, por inalação de gases atmosféricos e partículas e por transferência da mãe para o feto (através da placenta) ou da mãe para o bebé (por amamentação) caso a fêmea apresente EDC no seu corpo (Crawford *et al.*, 2017; Gore *et al.*, 2014; Kabir *et al.*, 2015; Soeiro e Ferreira, 2013; Wee e Aris, 2017).

A exposição a estes compostos, mesmo quando a baixas concentrações (na ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$), interfere com o sistema endócrino dos seres vivos, alterando as suas funções (Council, 2010; Noll et al., 2017; Plahuta *et al.*, 2017; Wee e Aris, 2017); sendo, por isso, associada a efeitos adversos ambientais, que afectam os ecossistemas e a saúde dos seres vivos, incluindo o ser humano

(Boshir *et al.*, 2017; Council, 2010; Crawford *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Mallozzi *et al.*, 2017; Plahuta *et al.*, 2017; Windsor *et al.*, 2017).

A Figura 4 mostra alguns dos efeitos da exposição dos EDC nos seres humanos, incluindo alterações das funções neurológicas, função reprodutiva debilitada, aumento da incidência do cancro e alterações na glândula da tiróide que podem resultar em efeitos adversos no desenvolvimento, metabolismo ou fisiologia adulta (Boshir *et al.*, 2017; Council, 2010; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Nollet e Lambropoulou, 2017; Soeiro e Ferreira, 2013; Wee e Aris, 2017).

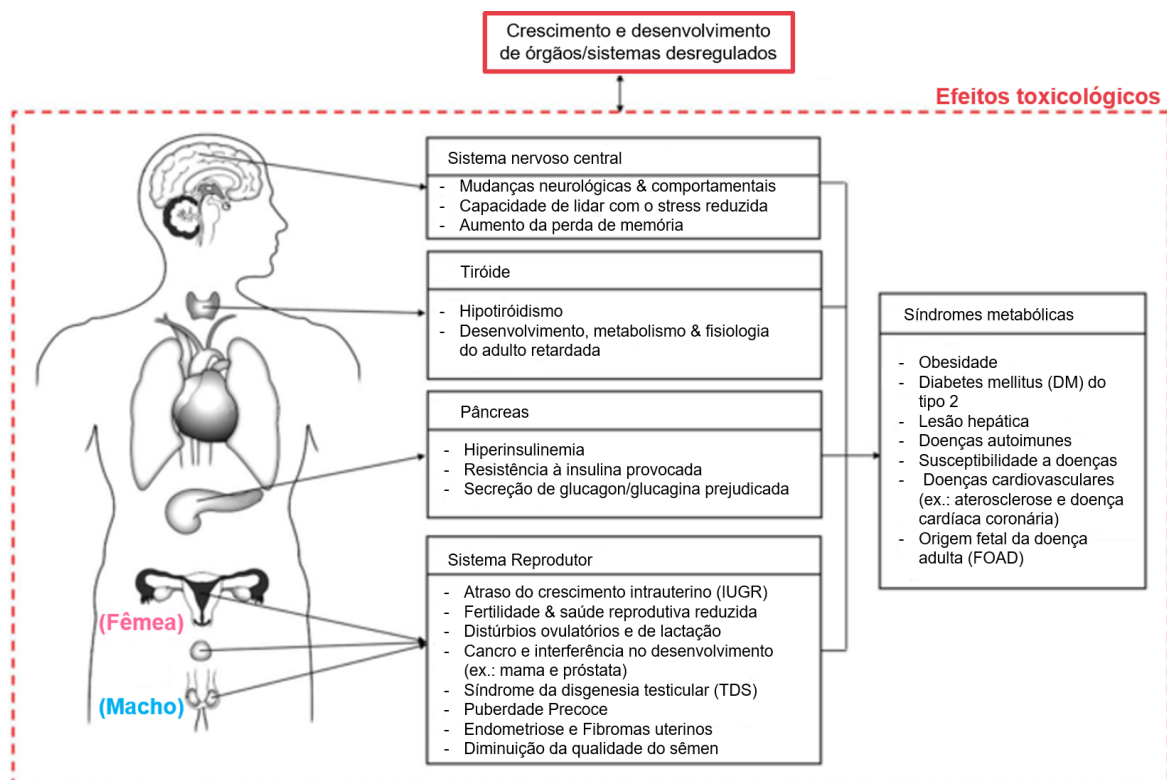


Figura 4 - Efeitos dos EDC na saúde humana. Fonte: adaptado de Wee e Aris (2017).

Tal como nos seres humanos, a vida selvagem quando exposta aos EDC está suscetível de desenvolver efeitos adversos fisiológicos e comportamentais (Tabela 5), principalmente ligados ao sistema reprodutor, nomeadamente, anomalias na determinação do sexo, na diferenciação sexual, no desenvolvimento sexual e no crescimento (Council, 2010; Crawford *et al.*, 2017).

Tabela 5 - Efeitos dos EDC na vida selvagem.

Espécie	Efeitos	Referências
Peixes	Feminização dos machos Indução da síntese de VTG Alteração e declínio da taxa de reprodução Alteração das concentrações de hormonas sexuais Colapso da população de peixes Desenvolvimento anormal de tecidos Função endócrina e reprodutiva desregulada Efeitos no sistema imunitário e imuno-depressivos Alteração das gónadas Alteração da determinação sexual do embrião Hermafroditismo Inibição do crescimento testicular Mortalidade elevada dos descendentes e da espécie Presença de órgãos reprodutores masculinos e femininos - <i>intersex</i> Efeitos no fígado, coração, rim e baço Alteração da qualidade do esperma	(Bila & Dezotti, 2007; Boshir <i>et al.</i> , 2017; Council, 2010; Crawford <i>et al.</i> , 2017; Hong, 2012; Soeiro e Ferreira, 2013)
Aves	Quebra de ovos Decréscimo da fertilidade Função reprodutiva desregulada e anomalias Efeitos no sistema imunitário	(Bila e Dezotti, 2007; Boshir <i>et al.</i> , 2017)
Tartaruga	Alteração na produção de ovos e quebra de ovos Indução da síntese de VTG	(Bila e Dezotti, 2007; Boshir <i>et al.</i> , 2017)
Mamíferos marinhos	Função reprodutiva desregulada Alteração no Sistema imunológico Efeitos imuno-depressivos	(Boshir <i>et al.</i> , 2017; Soeiro e Ferreira, 2013)
Mamíferos terrestres (rato)	Anomalias do sistema reprodutivo Ciclos de estro irregulares ou persistentes Atraso na idade do primeiro estro	(Bila e Dezotti, 2007; Council, 2010)
Anfíbios	Anomalias no sistema reprodutivo Declínio da população	(Bila e Dezotti, 2007)
Molusco	Desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos em fêmeas- <i>imposex</i> Esterilização Deformações das conchas Declínio da fixação anual ao substrato	(Bila e Dezotti, 2007; Hong, 2012)
Réptil	Anomalias morfológicas nas gónadas (ex. redução no tamanho do pénis em jacarés) Alteração das concentrações de hormonas sexuais (ex. baixa concentração de testosterona) Alteração da determinação sexual do embrião Efeitos nos sistemas reprodutivo e imunitário	(Bila e Dezotti, 2007; Council, 2010; Hong, 2012; Soeiro e Ferreira, 2013)

4.3. 17 α -Etinilestradiol

4.3.1. Propriedades físico-químicas

O 17 α -Etinilestradiol ou EE2, é o estrogénio sintético (Adeel *et al.*, 2017; Barreiros *et al.*, 2016; Lofrano, 2012; Wise *et al.*, 2011) que deriva do estrogénio natural 17 β -Estradiol (E2) (Aris *et al.*, 2014; Barreiros *et al.*, 2016; Laurenson *et al.*, 2014); estes compostos são descritos como os EDC com maior potencial estrogénico e com maior capacidade de desregulação endócrina, mesmo quando presentes em concentrações muito baixas (Barreiros *et al.*, 2016; Hong, 2012; Ting e Praveena, 2017).

A estrutura molecular do EE2 (Figura 5) é semelhante à do estrogénio esteróide natural (E2) (Aris *et al.*, 2014; Wise *et al.*, 2011), pertencendo ao grupo esteróide C18 e como tal, apresentando uma estrutura tetracíclica (derivada do ciclopentanoperhidrofenantreno) que consiste em quatro anéis, um grupo fenólico com o hidroxilo em C3 (essencial para a sua actividade biológica), dois ciclo-hexanos e um ciclopentano (Adeel *et al.*, 2017; Hamid e Eskicioglu, 2012), caracterizando-se pela presença de um grupo etinilo em C17 que lhe confere maior resistência à biodegradação (Aris *et al.*, 2014; Hamid e Eskicioglu, 2012; Hong, 2012).

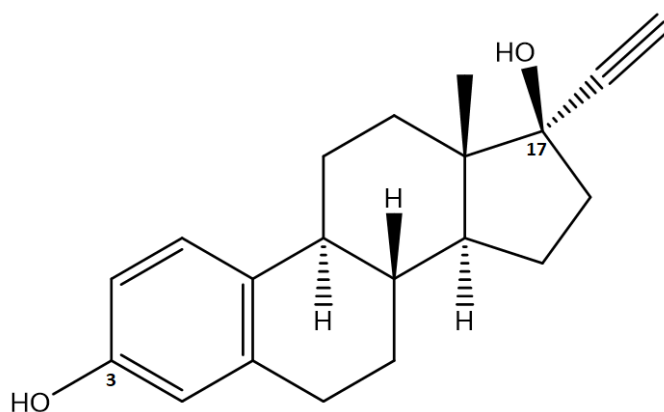


Figura 5 - Estrutura química do 17 α -Etinilestradiol.

As propriedades físico-químicas do EE2, apresentadas na Tabela 6, influenciam o seu comportamento e distribuição no ambiente sendo possível aferir o carácter hidrofóbico do composto, a sua tendência para adsorver aos sólidos, assim como a sua capacidade de resistir à biodegradação (Danielsson & Zhang, 1996; Silva, 2014).

O coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$), é definido como a proporção da concentração de um composto em *n*-octanol e água em condições de equilíbrio a uma temperatura específica, sendo uma medida da lipofilicidade e sorção de um composto e inversamente proporcional à solubilidade em água (Adeel *et al.*, 2017; Hamid e Eskicioglu, 2012; Silva, 2014). Assim, valores de K_{ow} superiores a 10^4 são associados a compostos hidrofóbicos, poucos polares, com alto potencial de sorção à matéria orgânica sólida; como é o caso do EE2 com valores de $\log K_{ow}$ entre 2,8 – 4,2 (Tabela 6) (Barreiros *et al.*, 2016; Ting e Praveena, 2017; Wee e Aris, 2017).

Adicionalmente, a baixa solubilidade em água apresentada pelo EE2 e o coeficiente de absorção ao solo relativamente alto (Tabela 6), reforçam a sua natureza hidrofóbica e capacidade de sorção, e ainda, o facto de o EE2 ser um ácido fraco (pKa elevado) (Adeel *et al.*, 2017) evidenciam a tendência que o EE2 tem para resistir à biodegradação e bioacumular-se no ambiente (Barreiros *et al.*, 2016; Hong, 2012; Silva, 2014; Wee e Aris, 2017).

Tabela 6 - Propriedades físico-químicas do 17 α -Ethinilestradiol.

CAS n^o 1	57-63-6	(Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014; Jones <i>et al.</i> , 2017; Wee e Aris, 2017)
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	(Aris <i>et al.</i> , 2014; Verlicchi <i>et al.</i> , 2012; Wee e Aris, 2017)
Ponto de Fusão (°C)	182 – 183	(Adeel <i>et al.</i> , 2017)
Peso molecular (g/mol)	296,4	(Adeel <i>et al.</i> , 2017; Aris <i>et al.</i> , 2014; Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014; Wee e Aris, 2017)
Log K_{ow} 2	3,67	(Adeel <i>et al.</i> , 2017; Aufartová <i>et al.</i> , 2011; Hamid e Eskicioglu, 2012)
	4,15	(Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014; Hong, 2012; Silva, 2014)
	4,12	(Wee e Aris, 2017)
	4,01	(Windsor <i>et al.</i> , 2017)
	3,9	(Aparicio <i>et al.</i> , 2017)
	4,14	(Aris <i>et al.</i> , 2014)
	2,8 – 4,2	(Council, 2010)
pK_a 3	10,4	(Adeel <i>et al.</i> , 2017; Aufartová <i>et al.</i> , 2011; Rahman <i>et al.</i> , 2009; Silva, 2014)
	10,46 – 10,70	(Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014; Hamid e Eskicioglu, 2012)
	10,7	(Aparicio <i>et al.</i> , 2017; Chambel, 2011)
Pressão de vapor ou Volatilidade	6 x 10 ⁻⁹ Kpa	(Adeel <i>et al.</i> , 2017; Hamid e Eskicioglu, 2012)
	1,95 x 10 ⁻⁹ mm Hg (a 25 °C)	(Wee e Aris, 2017)
	4,5 x 10 ⁻¹¹	(Aris <i>et al.</i> , 2014; Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014; Silva, 2014)
Solubilidade em água (mg/L)	4,8 (a 20 °C)	(Adeel <i>et al.</i> , 2017; Aris <i>et al.</i> , 2014; Barreiros <i>et al.</i> , 2016; Ben Fredj <i>et al.</i> , 2014)
	1,16 x 10 ² (a 25 °C)	(Hamid e Eskicioglu, 2012; Wee e Aris, 2017)
Potencial Estrogénico (relativamente ao 17β-Estradiol)	1 – 2.2 (1; 1.11;	(Hong, 2012)
	1.13; 1.19; 2.2)	
	1,19; 1,5	(Hamid e Eskicioglu, 2012)
Constante da lei de Henry (Pa m³/mol)	3,8 x 10 ⁻⁷	(Birkett e Lester, 2003; Hamid e Eskicioglu, 2012)
K_{oc} 4	4770	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
	4,766 x 10 ⁴	(Wee e Aris, 2017)
Log K_{oc} 5	5,22	(Birkett e Lester, 2003; de Mes <i>et al.</i> , 2005)
	2,91-3,04 L/kg	(Council, 2010)
EC50 6	1,2 ng/L	(Hong, 2012)
Meia-vida (dias) 7	4-6	(Chambel, 2011)
	81 ^a	
	3 – 4,5 ^b	(Adeel <i>et al.</i> , 2017)

¹ Chemical abstract services; ² Coeficiente de partição octanol-água; ³ Constante de acidez; ⁴ Coeficiente de sorção do solo; ⁵ Coeficiente de partição carbono-água; ⁶ Concentração do fármaco necessária para causar 50% da resposta máxima; ⁷ Meia-vida e a taxa de degradação variam consoante as condições REDOX do local, ligações covalentes, troca de ligandos, entre outros; ^a em condições aeróbias; ^b em solo arejado.

O EE2 em condições aeróbias apresenta uma meia-vida (*half-life*) de 81 dias, o que lhe confere uma elevada persistência no ambiente, que juntamente com as características enunciadas anteriormente, podem levar à sua bioacumulação e biomagnificação em organismos aquáticos (Adeel *et al.*, 2017; Aris *et al.*, 2014; Koh *et al.*, 2008).

Segundo Valormed (2015), citado por Vicente (2016), em termos de perigosidade no ambiente, o EE2 é classificado com 9 valores, numa escala de 0 a 9, tendo como parâmetros de avaliação: a persistência, a bioacumulação e a toxicidade.

4.3.2. Aplicações e Fontes de EE2

O EE2, é uma hormona biologicamente activa (Crawford *et al.*, 2017; Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017) utilizada, principalmente, como componente de contraceptivos orais, tendo ainda aplicações em terapias de reposição hormonal, suspensão da amamentação, deficiências motoras associadas à menopausa, tratamento de algumas doenças, bem como em farmacologia veterinária, nomeadamente na aquacultura e pecuária, para melhoria da produtividade, promovendo o crescimento, prevenindo e tratando distúrbios reprodutivos (Aris *et al.*, 2014; Barreiros *et al.*, 2016; Crawford *et al.*, 2017; Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Hong, 2012; Kabir *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Ting e Praveena, 2017; Zhang *et al.*, 2012).

Como referido no capítulo 4.2.3., existem várias formas dos EDC entrarem no ambiente, nomeadamente, a partir da indústria farmacêutica (fábrica de contraceptivos, por exemplo), efluentes hospitalares, aquacultura, produção de gado, água residual não tratada e efluentes provenientes de ETAR (Adeel *et al.*, 2017; Aris *et al.*, 2014; Aufartová *et al.*, 2011; Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Hamid e Eskicioglu, 2012; Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011; Plahuta *et al.*, 2017; Ting e Praveena, 2017) - Figura 6.

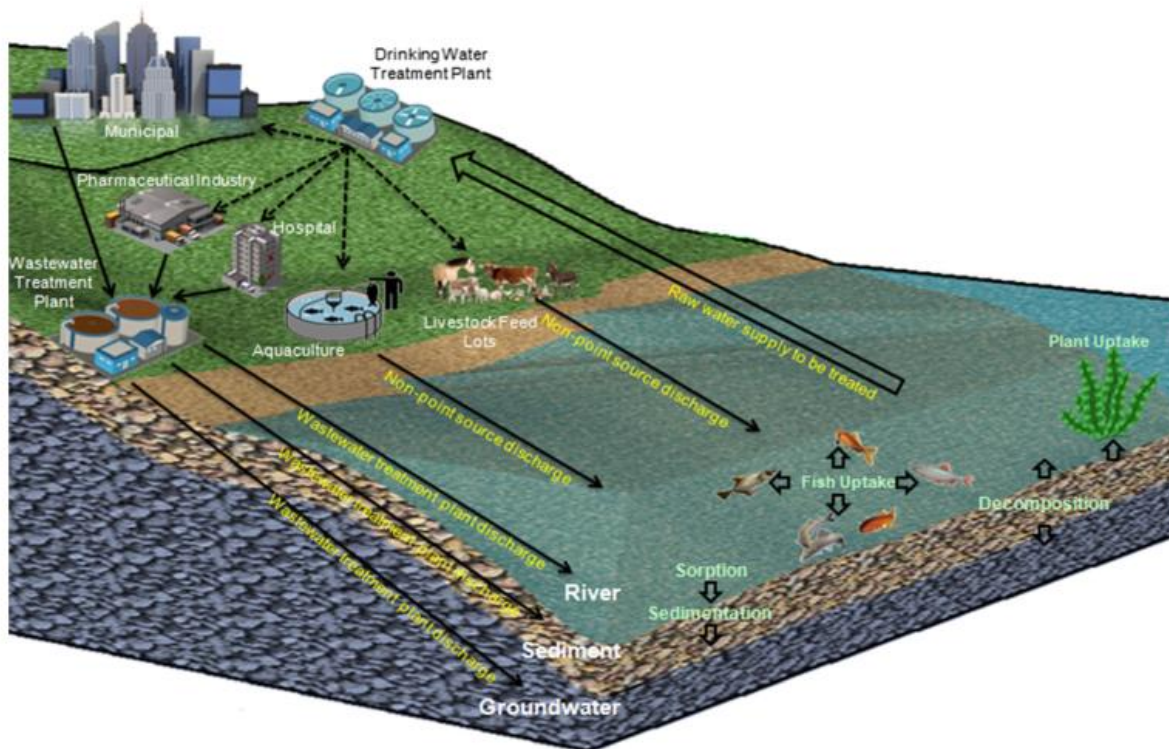


Figura 6 - Fontes e mecanismos de contaminação dos estrogênios esteróidicos. Fonte: adaptado de Ting e Praveena (2017).

A excreção humana de estrogênios sintéticos (EE2) é a principal via de entrada deste composto nas ETAR, principalmente por parte das mulheres que tomam a pílula contraceptiva - principal aplicação de EE2 (Aris *et al.*, 2014; Barreiros *et al.*, 2016; Hamid e Eskicioglu, 2012; Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010; Laurenson *et al.*, 2014; Ting e Praveena, 2017).

As pílulas contraceptivas são uma combinação de diferentes quantidades de estrogénio e progesterona, contendo cerca de 15 a 50 µg de EE2 por comprimido, sendo 35 µg/pílula a dosagem mais utilizada (Aris *et al.*, 2014; Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010; Ting e Praveena, 2017; Wise *et al.*, 2011).

Considerando que, cerca de 17% da população feminina dos países ocidentais tomam a pílula e que entre 20% e 48% da dose ingerida é metabolizada pelo organismo, Johnson e Williams (2004), desenvolveram um modelo de avaliação farmacêutica de metabolismo, excreção e transporte de modo a prever as concentrações excretadas de EE2 (Barreiros *et al.*, 2016; Johnson & Williams, 2004).

Na Figura 7, mostra-se que para uma concentração inicial de 26 µg/pílula, 43% do EE2 ingerido é totalmente metabolizado pelo organismo e os restantes 60% de EE2 são excretados na urina e fezes, chegando ao sistema de tratamento de águas residuais. Estima-se que 40% do EE2 ingerido ou seja, 10,5 µg/dia seja libertado nos efluentes de água residual na sua forma livre (Barreiros *et al.*, 2016; Hamid e Eskicioglu, 2012; Wise *et al.*, 2011).

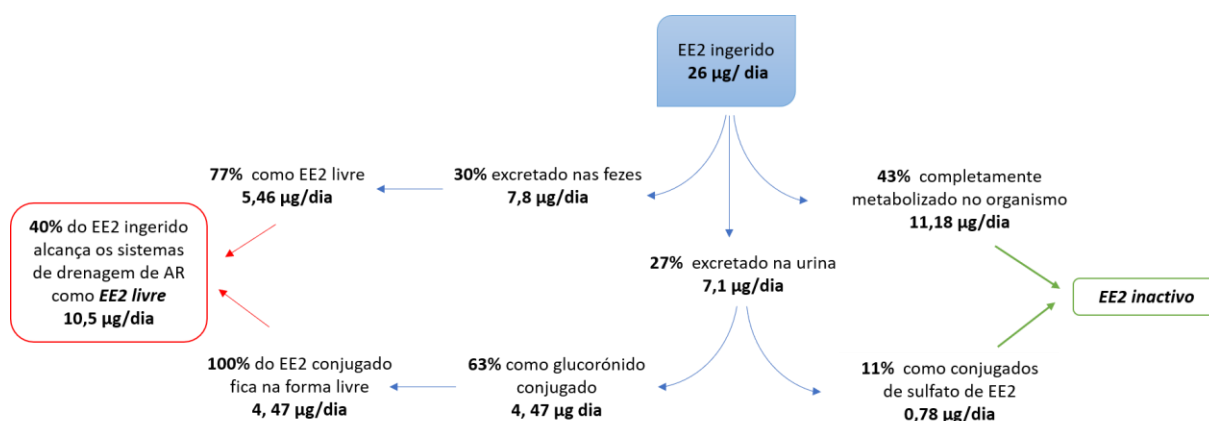


Figura 7 - Modelo desenvolvido por Johnson e Williams, em 2004, de modo a avaliar após a ingestão, o metabolismo, excreção e transformação ambiental do EE2. Os valores são todos aproximados e os valores finais quando somados não dão 100% do valor de EE2 ingerido.

Antes da sua excreção, o EE2 é transformado dando origem a metabolitos, conjugados de sulfato ou glucoronidos conjugados. As ETAR não removem completamente os estrogénios e respectivos conjugados e alguns retornam à sua forma livre (*free form*) devido à acção dos microrganismos, ficando disponíveis no ambiente e estroginicamente activos (Aris *et al.*, 2014; Hamid e Eskicioglu, 2012; Hong, 2012; Ting e Praveena, 2017; Wise *et al.*, 2011) .

Assim, as ETAR são consideradas a principal fonte de contaminação de EE2 nos ambientes aquáticos (Adeel *et al.*, 2017; Aris *et al.*, 2014; Barreiros *et al.*, 2016; Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Hamid e Eskicioglu, 2012; Hong, 2012; Pereira *et al.*, 2011; Ting e Praveena, 2017; Wise *et al.*, 2011).

4.3.3. Presença no ambiente

Com o crescimento populacional também o uso deste composto tendeu a aumentar, levando a um aumento da sua ocorrência e visibilidade no ambiente (Aris *et al.*, 2014), como tal os estrogénios tornaram-se poluentes de notável atenção devido às concentrações crescentes no solo e na água por todo o mundo (Adeel *et al.*, 2017).

O EE2 pode ser encontrado em várias matrizes ambientais, nomeadamente água, sedimentos e biota, principalmente em concentrações na ordem dos ng.L⁻¹ (Aris *et al.*, 2014; Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011). A ocorrência significativa deste composto tem sido especialmente detectada em locais próximos de ETAR (Adeel *et al.*, 2017; Aufartová *et al.*, 2011).

No entanto, vários estudos mostram evidências da presença de EE2 em águas subterrâneas, água de escoamento de campos agrícolas e de cultivo, águas superficiais, afluentes e efluentes de ETAR, assim como em água potável (Adeel *et al.*, 2017; Aufartová *et al.*, 2011; Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011; Silva, 2014).

Na Tabela 7, mostram-se as concentrações de EE2 em diferentes tipos de matrizes ambientais em águas portuguesas.

Tabela 7 - Ocorrência de EE2 em Portugal, concentrações medidas em diferentes matrizes e fontes.

Localização	Matriz	Concentração no ambiente (ng.L ⁻¹)	Referências
Rio Douro	Água do estuário	56 – 101,9	(Silva, 2014; Vilela <i>et al.</i> , 2018)
		0,58 – 2,76	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
		n.d. – 4,5	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Rio Mondego	Água do estuário	< LOD	(Silva, 2014)
Rio Sado	Água do estuário	< LOQ	(Silva, 2014)
		1,1 – 3,1	(Silva, 2014)
		1,1 – 2,8	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Rio Douro e Oceano Atlântico	Água do estuário	< LOD – 2,9	(Silva, 2014)
Rio Douro e Litoral do Porto	Água do estuário	1,0 – 1,3	(Silva, 2014)
		< LOD – 4,5	(Silva, 2014)
Rio Leça e Costa do Porto	Água do rio e da costa	2,1 – 4,4	(Silva, 2014)
	Água do rio	n.d. – 2,8	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Ria Formosa	Água superficial	12,1 – 25,0	(Silva, 2014)
		14,4 – 25,0	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Rio Ave e Litoral de Vila do Conde	Água do rio e litoral	0,3 – 20,4	(Silva, 2014)
		0,5 – 20,4	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Aveiro	Água da Ria e da ETAR de Aveiro	< LOD	(Silva, 2014)
Portugal	Água residual do tratamento secundário	391,4 ± 59,3	(Barbosa <i>et al.</i> , 2016)

LOD: Limite de deteção; LOQ: Limite de quantificação

Na Tabela 8 e na Tabela 9 mostram-se valores de concentração de EE2 em diferentes países do mundo, sendo que na primeira as concentrações são relativas a amostras de água potável.

Tabela 8 - Concentração de EE2 em água potável. Fonte: adaptado de Vilela *et al.* (2018).

Amostra de Água Potável	Concentração
Estados Unidos	0,002 ng.L ⁻¹
	< LOD
Alemanha	0,15 – 0,5 ng.L ⁻¹
	0,5 ng.L ⁻¹
Inglaterra	<1 – 4 ng.L ⁻¹

Na Tabela 9, mostram-se os valores de EE2 em várias matrizes - água superficial, água subterrânea, sedimentos e biota em vários países.

Tabela 9 - Concentrações de EE2 em várias matrizes.

País	Matriz	Concentração (ng.L ⁻¹)	Referência
Norte da China	Água Superficial	n.d.	(Wee e Aris, 2017)
	Água Subterrânea	n.d. a 0,26	(Wee e Aris, 2017)
	Sedimentos	n.d. – 9,26 ^a	(Aris <i>et al.</i> , 2014)
China	Água Superficial	n.d. a 1,5	(Wee e Aris, 2017)
China, Rio Yongding New	Água Superficial	n.d. – 12,0	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
China, Lagoa Yundang	Água Superficial	n.d. – 0,4	(Aris <i>et al.</i> , 2014; Vilela <i>et al.</i> , 2018)
	Sedimentos	n.d. – 2,48 ^a	(Aris <i>et al.</i> , 2014)
	Biota – Moluscos (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	3,42 ^a	(Aris <i>et al.</i> , 2014)
Estados Unidos	Água Superficial	< 1,0 a 1,4	(Wee e Aris, 2017)
		0,25 – 0,52	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
	Efluente de águas residuais	0,24 – 0,76	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Espanha, Rio Llobregat	Água Superficial	< 0,2 – 3,4	(Wee e Aris, 2017)
	Água Subterrânea	< 0,2	(Wee e Aris, 2017)
Espanha, Bacia do Rio Ibérico	Água Superficial	n.d. – 2,2	(Wee e Aris, 2017)
	Sedimentos	n.d. – 2,1 ^a	(Wee e Aris, 2017)
Espanha	Água Superficial	< 2,5	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Itália, Lagoa de Venezia	Água Superficial	< 0,8 – 34,0	(Wee e Aris, 2017)
	Sedimentos	< 2,0 – 41,0 ^a	(Aris <i>et al.</i> , 2014; Wee e Aris, 2017)
	Biota – Mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	< 3,0 – 38,00 ^a	(Aris <i>et al.</i> , 2014; Wee e Aris, 2017)
Itália	Água Residual Bruta	3 ± 2,6	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Alemanha	Água Superficial	< 0,1 – 5,1	(Wee e Aris, 2017)
Áustria	Água Superficial	n.d. – 0,33	(Wee e Aris, 2017)
	Água Subterrânea	n.d. – 0,94	(Wee e Aris, 2017)
Malásia, Rio Langat	Água Superficial	n.d. – 0,005	(Wee e Aris, 2017)
	Sedimento	n.d. – 3,29 x 10 ⁻⁴ ^a	(Wee e Aris, 2017)
Índia, Mumbai	Sedimento	14,47 – 29,17 ^a	(Wee e Aris, 2017)
Brasil	Água Residual Bruta	5	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
	Sedimentos	133,64 ^a	(Aris <i>et al.</i> , 2014)
França	Água Residual Bruta	< 0,2 – 20	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Suíça	Água Residual Bruta	< 1 – 5	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Inglaterra	Efluente de águas residuais	0,2 – 7,0	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
	Água Superficial	2 – 15	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Holanda	Efluente de águas residuais	< 0,2 – 7,6	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Israel	Água Superficial	6,1	(Vilela <i>et al.</i> , 2018)
Austrália	Água Superficial	0 – 0,52	(Aris <i>et al.</i> , 2014)
	Sedimentos	< 0,05 – 0,50 ^a	(Aris <i>et al.</i> , 2014)

n.d.: não detetado; ^a ng/g peso seco

4.3.4. Impactes e principais efeitos

A presença de EE2 no ambiente, mesmo em concentrações na ordem dos ng.L⁻¹, é passível de provocar algumas patologias e anomalias comportamentais nos organismos aquáticos, podendo interferir na proliferação da espécie e afetar a população como um todo, assim como no ecossistema (Barreiros *et al.*, 2016; Plahuta *et al.*, 2017; Wee e Aris, 2017).

Ao longo dos anos, inúmeros estudos demonstraram que a presença de EE2 no ambiente aquático pode provocar feminização de peixes do sexo masculino, através da redução do tamanho dos testículos, menor contagem e qualidade de esperma, indução da produção da vitelogenina, aumento da intersexualidade que levam à alteração da função reprodutiva, nomeadamente redução da fertilidade e fecundidade e consequentemente, redução do sucesso reprodutivo (Adeel *et al.*, 2017; Aris *et al.*, 2014; Ben Fredj *et al.*, 2014; Bergman *et al.*, 2012; Hamid e Eskicioglu, 2012; Laurenson *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011; Wee e Aris, 2017).

Adicionalmente, a presença deste composto, demonstrou provocar uma considerável redução da biomassa nos peixes e alteração da cadeia alimentar e redução da taxa de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento em estágios iniciais de vida, assim como alterações comportamentais (rituais de acasalamento alterados) podendo originar a extinção da espécie aquática (Adeel *et al.*, 2017; Ben Fredj *et al.*, 2014; Bergman *et al.*, 2012; Hamid e Eskicioglu, 2012; Laurenson *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011; Wee e Aris, 2017).

Devido ao seu potencial de bioacumulação, o EE2 pode entrar na cadeia alimentar humana, levando ao aumento do risco de desenvolvimento do cancro da mama, da próstata e testicular, hipospadias, síndrome da disgenese testicular, endometriose, promovendo processos reprodutivos anormais, como o aparecimento da menopausa precoce e a virilização de mulheres assim como desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Adeel *et al.*, 2017; Barreiros *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2011; Wise *et al.*, 2011).

Na Suécia, recentemente, foi realizado um estudo com a alga verde, *Chlamydomonas reinhardtii*, exposta a 7 μM de EE2. A exposição a este composto provocou efeitos negativos no crescimento e na fotossíntese desta alga (Adeel *et al.*, 2017). Segundo Crawford *et al.* (2017), as algas conseguem absover facilmente o EE2, promovendo a sua entrada nas cadeias alimentares e afectando outros níveis tróficos.

Por sua vez, Bergman *et al.* (2012), avaliou a exposição de anfípodes de água doce, *Gammarus pulex*, a EE2 e concluiu que o número de exemplares femininos na população aumentou. Relativamente ao efeito deste composto sobre os anfíbios, Matthiessen *et al.* (2017), afirmou que a exposição a concentrações de EE2 na ordem dos 4,8 – 6,1 ng.L^{-1} , afectaram negativamente larvas das rãs verdes, *Rana clamitans*, e observaram o aparecimento de larvas de rã mink selvagem (*wild mink frog*), *Rana septentrionalis*, com gônadas intersexuais.

Além destas conclusões, estudos utilizando *Danio rerio* mostraram que os efeitos decorrentes de uma exposição crónica são, na sua maioria, superiores aos efeitos provocados por exposições de curto prazo, com efeitos sobre a saúde diferentes; também existiram relatos de aparecimento de efeitos imprevistos após exposições crónicas (Windsor *et al.*, 2017).

Por outro lado, Crawford *et al.* (2017) e Windsor *et al.* (2017), após estudos com peixes das espécies *Pimephales promelas* e *Danio rerio*, respetivamente, concluíram que os efeitos do EE2 não são necessariamente permanentes, alguns são de natureza transitória e o organismo é capaz de recuperar após a remoção à exposição.

4.3.5. Remoção de EE2 em ETAR

As ETAR convencionais foram projetadas para tratamento e remoção, biológica e físico-química, da carga de carbono orgânico, de nutrientes (N e P) e agentes patogénicos presentes na água residual, não tendo sido concebidas e otimizadas com o intuito de remover estrogénios esteróides (Aris *et al.*, 2014; Ben Fredj *et al.*, 2014; Hamid e Eskicioglu, 2012; Prasse *et al.*, 2015; Ting e Praveena, 2017)

O tratamento convencional, aplicado num sistema de tratamento de água residual, envolve três estágios, designados como tratamento preliminar, tratamento primário e tratamento secundário (ou biológico) (Koh *et al.*, 2008; Silva, 2014), podendo apresentar tratamento terciário, caso o efluente seja descarregado para massas de água superficiais (de Mes *et al.*, 2005; Hamid e Eskicioglu, 2012; Koh *et al.*, 2008).

A configuração dos sistemas de tratamento convencionais não foi desenhada com o objectivo de remover estes compostos, contudo, através dos processos utilizados, observa-se a remoção parcial e/ou a diminuição da concentração destes (Aris *et al.*, 2014; Silva, 2014; Ting e Praveena, 2017).

De um modo geral, a remoção de estrogénios em ETAR dá-se através da adsorção aos sólidos em suspensão, gorduras e óleos presentes em AR, da biodegradação aeróbia ou anaeróbia, da degradação química e volatilização (Birkett e Lester, 2003; Rosa, 2008; Ting e Praveena, 2017); sendo que os mecanismos de transformação e de biodegradação são considerados os principais responsáveis na remoção destes compostos, assim como a adsorção apresenta um papel significativo na remoção destas hormonas (Koh *et al.*, 2008).

No tratamento preliminar, são removidos os materiais flutuantes e os sólidos de grandes dimensões da AR, com o objetivo de proteger o sistema de tratamento. Nesta etapa, a remoção do EE2 é considerada muito reduzida ou insignificante (Council, 2010; Hamid e Eskicioglu, 2012; Koh *et al.*, 2008; Rosa, 2008).

O tratamento primário, promove a adsorção dos estrogénios aos sólidos, gordura e óleos e consequente remoção por flotação ou sedimentação dos sólidos no decantador primário (Hamid e Eskicioglu, 2012; Koh *et al.*, 2008; Rosa, 2008; Ting e Praveena, 2017). A remoção obtida nesta etapa é influenciada, maioritariamente, pelas propriedades físico-químicas dos compostos, nomeadamente a hidrofobicidade, carga hidráulica, tempo de retenção, características de sedimentação e teor de sólidos suspensos (Hamid e Eskicioglu, 2012; Koh *et al.*, 2008; Rosa, 2008). Porém, estudos indicam que a remoção no tratamento primário é muito baixa ou quase inexistente (Hamid e Eskicioglu, 2012; Ting e Praveena, 2017).

O tratamento secundário ou biológico, que consiste na remoção da matéria orgânica através de processos aeróbios ou anaeróbios, é relatado como a etapa mais relevante na remoção dos compostos estrogénicos (Barbosa *et al.*, 2016; Hamid e Eskicioglu, 2012; Koh *et al.*, 2008; Silva, 2014; Ting e Praveena, 2017). Nesta fase, a remoção de EDC ocorre através da degradação e transformação biológica ou química, adsorção aos flocos microbiológicos e posterior remoção no decantador secundário, assim como processos de volatilização no arejamento (Barbosa *et al.*, 2016; Chambel, 2011; Hamid e Eskicioglu, 2012).

Os mecanismos de biodegradação e biotransformação desempenham o papel mais importante nesta fase, verificando-se maior biodegradação do EE2 em sistemas aeróbios e em sistemas de lamas ativadas com nitrificação (Boshir *et al.*, 2017; Council, 2010; Koh *et al.*, 2008; Ting e Praveena, 2017).

Na Tabela 10, mostram-se alguns exemplos de sistemas de tratamento secundário e as respectivas remoções de EE2.

Tabela 10 - Sistemas de tratamento secundário com remoção do EE2.

Tipo de tratamento	Remoção (%)	Referências
Lamas ativadas	17 – 90 ^a	(Ting e Praveena, 2017)
	65	(Koh <i>et al.</i> , 2008)
	85	(Birkett e Lester, 2003; Hamid e Eskicioglu, 2012; Koh <i>et al.</i> , 2008)
	100	(Boshir <i>et al.</i> , 2017)
Lamas ativadas - Aeróbio	28,7	(Ting e Praveena, 2017)
Lamas ativadas - Anaeróbio	41,5	(Ting e Praveena, 2017)
Lamas ativadas com UV ^b	77 – 100	(Ting e Praveena, 2017)
	75,4	(Ting e Praveena, 2017)
Lamas ativadas c/ Cloração	100	(Ting e Praveena, 2017)
	94	(Ting e Praveena, 2017)
Leito Percolador (Trickling filter)	75	(Ting e Praveena, 2017)
MBR ^c	71	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
	92,9	(Boshir <i>et al.</i> , 2017)
Lagoa de macrófitas (<i>Biological treatment technology - Polishing pond (algae)</i>)	95	(Boshir <i>et al.</i> , 2017)
Fitoetar (<i>Wetland technologies - Constructed Wetland</i>)	75,3 – 94	(Boshir <i>et al.</i> , 2017)
Fitoetar de fluxo vertical (<i>Wetland technologies – VFCW</i>)	75	(Boshir <i>et al.</i> , 2017)

^a gama de valores obtidos em 5 países (Espanha, China, África do Sul, Irão e Reino Unido); ^b UV – Ultravioleta; ^c Bioreatores de membranas.

Da observação da Tabela 10, verifica-se que as remoções do EE2, associadas ao tratamento secundário, apresentam uma ampla gama de valores; que segundo Koh *et al.* (2008), é resultado da

variação de parâmetros operacionais que controlam estes processos, nomeadamente o tempo de retenção, a idade das lamas, potencial redox e temperatura.

Com o objetivo de alcançar melhores eficiências de remoção, existem duas abordagens viáveis, (i) otimizar a tecnologia de tratamento existente, ou por outro lado, (ii) adicionar tecnologia de fim de linha que permita remover completamente estes compostos (Koh *et al.*, 2008).

Os processos de fim de linha e tratamento terciário serão abordados no capítulo 4.5.

4.4. Legislação

Nos últimos anos, a crescente preocupação com a presença dos EDC nos ecossistemas aquáticos tem sido o foco de organizações governamentais e não-governamentais, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Sociedade Endócrina, a União Europeia (EU) e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA) (Fernandes, 2012; Gore *et al.*, 2014; Guedes-Alonso *et al.*, 2014).

Como resultado, algumas abordagens e regulamentos foram publicados, estabelecendo limites de concentração para alguns dos poluentes em ambientes aquáticos e de modo a avaliar o risco destes compostos no sistema endócrino humano e organismos aquáticos (Aparicio *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2016; Fernandes, 2012; Ting e Praveena, 2017). No entanto, não existem limites de descarga legais para o ambiente e poucas são as medidas e/ou soluções, sob a forma de regulamentos ou leis, para mitigar este problema (Barbosa *et al.*, 2016; Crawford *et al.*, 2017; Fernandes, 2012).

O processo de estabelecimento de abordagens e regulamentos relativamente a esta temática tem vindo a ser abordado não só pela União Europeia, como pelos EUA, Canadá e Japão (Ting e Praveena, 2017). Na Tabela 11 estão identificados alguns dos regulamentos e abordagens elaborados até à data.

Tabela 11 - Regulamentos/abordagens para estrogénios esteróides. Fonte: adaptado de Ting e Praveena (2017).

País	Regulamento/ Abordagem	Campo
EUA	Lista de Candidatos a Contaminantes (CCL ₃ - Contaminant Candidate List)	Água potável
	Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos (EDSP - Endocrine Disruptor Screening Program)	Ingestão farmacêutica
Canadá	Regulamentação dos efluentes dos sistemas de águas residuais (Wastewater Systems Effluent Regulations)	Água Residual
Japão	Programa estratégico sobre Desreguladores Endócrinos (SPEED - Strategic Program on Endocrine Disruptors)	Ambiente e organismos
União Europeia	Diretiva 96/22/EC	Usos na agricultura e aquacultura
	Directiva 2003/74/EC	Controlo veterinário
	Directiva 2000/60/EC	Águas superficiais e subterrâneas
	Diretiva 2008/105/EC	Águas superficiais
	Diretiva 2013/39/EU	Águas Superficiais

A Directiva 2000/60/CE, de 23 de outubro, também designada como Diretiva-Quadro da Água (DQA), é, actualmente, o principal instrumento da política de água da União Europeia, que visa alcançar o bom estado químico e ecológico das massas de água superficiais e subterrâneas, bem como prevenir a sua deterioração (Barbosa *et al.*, 2016; Laurenson *et al.*, 2014; Ting e Praveena, 2017).

Esta diretiva estabelece a estratégia da UE contra a poluição da água por substâncias de alto risco, exigindo aos Estados Membros e Estados Associados o estabelecimento de programas de monitorização da qualidade da água (Aufartová *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2016). Assim, através da Decisão nº. 2455/2001/ CE, foi definida a primeira lista de substâncias prioritárias, reguladas pela DQA, que conta com a identificação de 33 elementos e da qual não consta o EE2, composto abordado neste estudo (Agency, 2017; Crawford *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017).

Por sua vez, a Diretiva 2008/105/CE, retifica a diretiva anterior e estabelece normas de qualidade ambiental (NQA) a fim de alcançar o bom estado químico das águas superficiais para substâncias prioritários e outros poluentes identificados no Anexo I, da mesma diretiva; fazendo também a distinção entre substâncias prioritárias e substâncias perigosas prioritárias (Barbosa *et al.*, 2016; Pintado-Herrera *et al.*, 2014; Ting e Praveena, 2017).

Posteriormente, no que diz respeito às substâncias prioritárias no domínio da política da água, a Diretiva 2000/60/CE e a Diretiva 2008/105/CE foram alteradas pela Diretiva 2013/39/EU (Barbosa *et al.*, 2016; Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Ting e Praveena, 2017), onde é apresentada uma nova lista de substâncias prioritárias, com um total de 45 elementos, não constando o composto em estudo (EE2).

No Artigo 8º-b desta diretiva, é estabelecida a necessidade de uma lista de vigilância de substâncias, com base no risco que estas apresentam no domínio da água para a UE e em casos em que os dados não são suficientes; assim em toda a UE, devem ser recolhidos, dados de monitorização com o objetivo de sustentar a prioridade de inclusão destas em futuras revisões da lista de substâncias (Ting e Praveena, 2017).

Como requerido na Diretiva 2013/39/EU, a Decisão de Execução 2015/495 estabelece a primeira lista de vigilância, com um total de 10 substâncias a monitorizar, nas quais está incluído o EE2, a fim de recolher dados, com vista a facilitar a determinação de medidas adequadas para fazer face ao risco que estas substâncias constituem.

No documento referido anteriormente, as especificidades de monitorização do etinilestradiol foram obtidas com o método SPE-LC-MS-MS e correspondem a um limite de deteção de 0,035 ng.L⁻¹.

A DQA foi transposta para a ordem judicial nacional através da Lei nº 58/2005 (Lei da Água), estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas (Ambiente, 2017; Guerreiro, 2005).

4.5. Desinfecção de Águas Residuais Tratadas

4.5.1. Importância da desinfecção

A desinfecção é, na maioria das vezes, o último passo da linha de tratamento de águas residuais antes da sua descarga para o meio recetor (Noutsopoulos *et al.*, 2014).

Este processo representa um tratamento fundamental uma vez que garante a qualidade de descarga e minimiza os riscos para a saúde pública e do ambiente, (Eckert e Eckert, 2013; Pan *et al.*, 2014; Ragazzo *et al.*, 2017), nomeadamente o risco de proliferação de doenças transmitidas pela água (da Costa *et al.*, 2014; Eckert e Eckert, 2013), através da destruição parcial ou inativação de microrganismos patogénicos presentes na água residual (Eckert e Eckert, 2013; Gagnon *et al.*, 2008; Metcalf & Eddy, 2003; Noutsopoulos *et al.*, 2014; Victoria, 2002).

Os microrganismos entéricos presentes nas águas residuais que representam um risco potencial para saúde dos seres humanos e gado e com grande suscetibilidade de se disseminarem pelo ambiente, pertencem às seguintes categorias de organismos: bactérias, protozoários (oócitos e cistos), helmintos (vermes parasitas) e vírus (Eckert e Eckert, 2013; Metcalf & Eddy, 2003; Saraiva, 2015; Shannon *et al.*, 2008; Victoria, 2002).

Segundo a OMS, a falta de saneamento ou o saneamento inadequado estão ligados à transmissão de doenças como a cólera, diarreia, hepatite A, disenteria, febre tifoide, contribuindo também para a

desnutrição; estimando que 2,3 mil milhões de pessoas ainda não tem acesso a instalações sanitárias básicas (WHO, 2018).

Na Tabela 12 apresentam-se alguns dos organismos patogénicos presentes em águas residuais, bem como as possíveis doenças.

Tabela 12 - Microrganismos patogénicos possivelmente presentes em água residual não tratada. Fonte: (Metcalf & Eddy, 2003; Saraiva, 2015; Victoria, 2002).

	Organismo patogénico	Doença	Sintomas/ Observações
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite	Diarreia
	<i>Legionella pneumophila</i>	Doença do legionário (pneumonia)	Indisposição, mialgia, febre, dor de cabeça, doença respiratória
	<i>Shigella</i> (spp.)	Sigelose	Disenteria Bacilar
	<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Diarreia extremamente forte, desidratação
	<i>Salmonella typhi</i>	Febre Tifóide	Febre alta, Diarreia, Úlceras no intestino delgado
	<i>Salmonella</i> (≈2100 serotipos)	Salmonelose	Intoxicação alimentar
Protozoários	<i>Giardia lamblia</i>	Giardiase (gastroenterite)	Diarreia leve a forte, náuseas, indigestão
	<i>Balantidium coli</i>	Balantidiásias	Diarreia, Disenteria
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Criptosporidiose	Diarreia
Helmintos	<i>Taenia spp</i>	Teníase	Ténia em seres humanos (causa carne de bovino e porco infectada)
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariíase	Infestação por lombrigas
Vírus	<i>Enterovírus</i> (mais de 100 tipos, por exemplo: polio, eco e coxsackie vírus)	Gastroenterite, anomalias no coração, meningite	
	Hepatite A	Hepatite infecciosa	Icterícia, febre
	Rotavírus	Gastroenterite	
	Adenovírus (31 tipos)	Doença respiratória	

A diarreia, por exemplo, segundo dados da OMS é responsável pela morte de 361 000 crianças por ano, com menos de 5 anos, enquanto 21 000 a 143 000 pessoas morrem em todo o mundo devido à cólera (WHO, 2017).

Os parâmetros microbiológicos nem sempre são incluídos nos padrões de tratamento de águas residuais (Lazarova *et al.*, 1998), no entanto devido à escassez de água e à necessidade crescente de reutilização de água, a atenção dada à qualidade microbiológica e aos potenciais riscos para saúde provenientes dos efluentes é consideravelmente maior e irá, certamente, aumentar no futuro (Luukkonen *et al.*, 2014; Ragazzo *et al.*, 2017).

Contudo, existem restrições legislativas em muitos países, nomeadamente quando a descarga de efluentes de ETAR é encaminhada para massas de água perto de zonas balneares, ou é usado direta ou indiretamente para fins agrícolas, usos domésticos ou recreativo, como por exemplo a pesca ou a piscicultura (Amoatey e Bani, 2011; da Costa *et al.*, 2014; Lazarova *et al.*, 1998; Luukkonen *et al.*, 2014; Ragazzo *et al.*, 2017).

Em Portugal, o Decreto-Lei nº. 236/98, de 1 de Agosto, estabelece as normas, critérios e objetivos de qualidade, nomeadamente microbiológica, com o objetivo de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos (consumo humano e rega, por exemplo) (Guerreiro, n.d.), por sua vez, a norma portuguesa (NP) 4434:2005 visa os requisitos de qualidade para a reutilização de águas residuais urbanas tratadas na rega de campos agrícolas, florestais, ornamentais, viveiros e outros espaços verdes (Monte e Albuquerque, 2010).

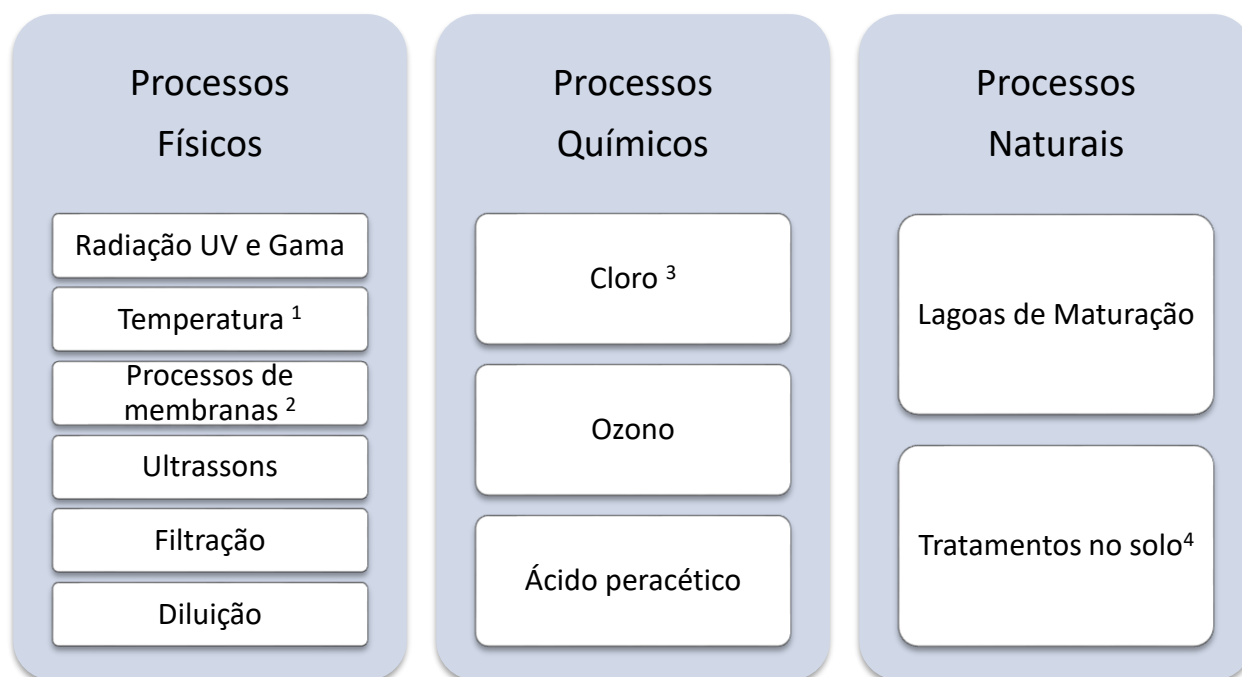
Para além da redução e inativação de microrganismos patogénicos considerando as normas e objetivos de cada entidade reguladora (Victoria, 2002), a desinfecção apresenta outros benefícios, nomeadamente a possibilidade de remoção de contaminantes químicos (Gagnon *et al.*, 2008) e deve garantir os seguintes objetivos de desempenho ambiental (Chhetri *et al.*, 2017; Victoria, 2002):

- Não resultar num aumento de toxicidade na descarga das águas residuais;
- Ser confiável, tecnicamente compatível e rentável;
- Não resultar em riscos incrementais para a saúde humana ou ambiente devido ao seu transporte, armazenamento ou manuseamento de substâncias químicas e/ou subprodutos da desinfecção.

4.5.2. Tratamentos convencionais

O tratamento terciário é aplicado quando existe a necessidade de melhorar a qualidade do efluente secundário, removendo azoto, fósforo, metais pesados, compostos biológicos biodegradáveis e inativando microrganismos patogénicos (Amoatey e Bani, 2011; Ting e Praveena, 2017).

Nesta fase, o processo de desinfecção engloba várias técnicas que envolvem o uso de agentes físicos, químicos e naturais (Figura 8) de modo a inativar bactérias, vírus e protozoários (da Costa *et al.*, 2014; Eckert e Eckert, 2013; Saraiva, 2015) e que podem ser utilizados individualmente ou em conjunto (Luukkonen *et al.*, 2014).



¹ Ebulição, pasteurização; ² Microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa; ³ Cloro gasoso, dióxido de cloro e hipoclorito de sódio e de cálcio; ⁴ infiltração-percolação.

Figura 8 - Processos de desinfecção: Físicos, Químicos e Naturais. Fonte: adaptado de Monte e Albuquerque (2010).

Os métodos químicos para além de terem um papel crucial na eliminação/redução de microrganismos nocivos, são oxidantes poderosos com a capacidade de oxidar contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes na AR, nomeadamente os estrogénios e outros micropoluentes (Acero *et al.*, 2013; Bolong *et al.*, 2009; da Costa *et al.*, 2014), na maioria das vezes, para compostos facilmente biodegradáveis e menos tóxicos (Boshir *et al.*, 2017).

Na Tabela 13 são apresentados alguns processos de tratamento terciário e respectivas eficiências de remoção do EE2.

Tabela 13 - Remoção do EE2 em sistemas de tratamento terciário.

Tipo de tratamento		Remoção (%)	Referências
	Ozonização	95-100	(Pereira <i>et al.</i> , 2011)
		100	(Boshir <i>et al.</i> , 2017)
		>95	(Koh <i>et al.</i> , 2008)
		>90	(Huber, 2010)
	Cloragem	100	(Boshir <i>et al.</i> , 2017; Moriyama <i>et al.</i> , 2004; Pereira <i>et al.</i> , 2011)
	Dióxido de Cloro	~100	(Pereira <i>et al.</i> , 2011)
	Óxido de Manganês (MnO ₂)	81,7	(De Rudder <i>et al.</i> , 2004)
	Fotocatálise	Até 100	(Boshir <i>et al.</i> , 2017)
	Filtração com areia	70	(Birkett e Lester, 2003)
	Lagoa de Macrófitas	n.d	(Ifelebuegu, 2011)
	Nanofiltração	92	(Pereira <i>et al.</i> , 2012)
Sistemas Híbridos	MBR + UF	95,5	(Boshir <i>et al.</i> , 2017)
	MBR + NF	94	
	MBR + RO	93,61	
	Floculantes + LA + UF	95	

MBR – Bioreactores de membranas; UF – Ultrafiltração; NF – Nanofiltração; LA – Lamas Activadas; RO – Osmose reversa.

Dos processos enunciados, a cloragem, a par com a radiação UV são as tecnologias de desinfecção mais frequentes em ETAR (Eckert e Eckert, 2013; Noutsopoulos *et al.*, 2014). Alguns autores consideram que, também, o ozono é comum nos processos de tratamento de água residuais (Bhatt, 2016; Chhetri *et al.*, 2014; Isabel & Miranda, 2014; Pereira *et al.*, 2011; Prasse *et al.*, 2015).

No entanto, a desinfecção com recurso ao cloro é o método mais amplamente utilizado e aceite para o tratamento de águas (Bhatt, 2016; Chhetri *et al.*, 2014; da Costa *et al.*, 2014; Eckert e Eckert, 2013; Jewell e Wilson, 2011; Pan *et al.*, 2014; Prasse *et al.*, 2015), atendendo que apresenta elevado poder biocida, inactivando uma ampla gama de microrganismos patogénicos (Bhatt, 2016; Chhetri *et al.*, 2014; Eckert e Eckert, 2013; Graham *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011); facilidade de aplicação (Bhatt, 2016; Pan *et al.*, 2014) e viabilidade do ponto de vista económico, com baixo custo químico e operacional (Acero *et al.*, 2013; Bhatt, 2016; Eckert e Eckert, 2013; Pan *et al.*, 2014).

Na desinfecção, os compostos de cloro geralmente utilizados em águas residuais e águas de abastecimento são o cloro gasoso, o hipoclorito de sódio e o dióxido de cloro (Acero *et al.*, 2013; Qasim, 1994).

O cloro hidrolisa na presença de água e forma ácido hipocloroso (HOCl), que por sua vez se dissocia em hipoclorito (ClO⁻) (Acero *et al.*, 2013; Qasim, 1994), estas são as principais espécies de cloro presentes em água e a sua quantidade representa o cloro residual (Qasim, 1994).

Contudo, diversos estudos afirmam que o cloro residual em efluentes de ETAR pode ser prejudicial e tóxico para os organismos aquáticos (Bhatt, 2016; da Costa *et al.*, 2014; Graham *et al.*, 2012; Karpova *et al.*, 2013), sendo necessário uma descloração antes da descarga para o meio receptor, o que acresce o custo deste processo (Bhatt, 2016; Graham *et al.*, 2012; Karpova *et al.*, 2013). Além disto, o cloro reage facilmente com matéria orgânica dissolvida e presente em águas residuais o que potencia a formação de subprodutos da desinfecção, que são nocivos (Acero *et al.*, 2013; Bhatt, 2016; Boshir *et al.*, 2017; Eckert e Eckert, 2013; Jewell e Wilson, 2011; Pan *et al.*, 2014). Alguns destes produtos, apresentam uma grande preocupação para a comunidade científica, devido ao seu carácter cancerígeno, mutagénico, citotóxico e/ou genotóxico (Block *et al.*, 2015; da Costa *et al.*, 2014; Prasse *et al.*, 2015) e devido à sua persistência e capacidade de bioacumulação (Karpova *et al.*, 2013).

Inúmeros subprodutos da desinfecção são conhecidos, contudo, existem ainda muitos por identificar (Block *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011), no entanto as classes mais abundantes são os trihalometanos, que incluem clorofórmio, diclorobromometano, dibromoclorometano e bromofórmio e os ácidos haloacéticos (Acero *et al.*, 2013; Block *et al.*, 2015; Eckert e Eckert, 2013; Graham *et al.*, 2012; Jewell e Wilson, 2011; Karpova *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2014).

Para além destes compostos, a utilização do cloro pode levar à formação de produtos de transformação resultantes de reações químicas com EDC (Gervais *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2011; Prasse *et al.*, 2015). No caso do EE2, esta interação pode originar vários compostos, como o 4-cloro-EE2 e o 2,4-dicloro-EE2; segundo Pereira *et al.* (2011). O primeiro apresenta uma atividade endócrina semelhante à do composto original (EE2), enquanto que o segundo, é cerca de 10 vezes menos potente que o EE2. No entanto, Prasse *et al.* (2015) indica que ambos apresentam capacidade de disrupção inferior à do EE2.

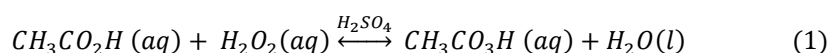
Assim, tornou-se imperativo a identificação e utilização de desinfetantes alternativos eficazes, económicos e de baixa toxicidade (Bhatt, 2016; Block *et al.*, 2015; da Costa *et al.*, 2014; Graham *et al.*, 2012).

4.5.3. Ácido peracético

O ácido peracético (PAA) emergiu como uma das principais alternativas químicas para a desinfecção (Bhatt, 2016; Block *et al.*, 2015; Chhetri *et al.*, 2014; Chhetri *et al.*, 2016; Dell'Erba *et al.*, 2007; Eckert e Eckert, 2013; Ragazzo *et al.*, 2017), não só devido à consciencialização para os problemas inerentes à utilização do cloro (Luukkonen e Pehkonen, 2016; Santoro *et al.*, 2007), como também devido ao seu forte poder desinfetante, conseguindo abranger um amplo espectro de atividade microbiana (Chhetri *et*

al., 2016; Eckert e Eckert, 2013; Sarathy *et al.*, 2016) e à produção de subprodutos inofensivos (Dell'Erba *et al.*, 2007; Ragazzo *et al.*, 2017).

O ácido peracético (CH₃CO₃H), também conhecido por ácido peroxiacético é um peróxido orgânico alifático com elevado poder de oxidação (Karpova *et al.*, 2013; Leverenz, 2006; Santoro *et al.*, 2007), que resulta da reação do ácido acético (CH₃CO₂H) e do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) na presença de um catalisador, muitas vezes o ácido sulfúrico a 1% (1) ou da oxidação do acetaldeído (Eckert e Eckert, 2013; Leverenz, 2006; Luukkonen e Pehkonen, 2016; Santoro *et al.*, 2007; Silva, 2010).



O PAA não é produzido no seu estado puro (Block, 2016), estando, comercialmente disponível numa mistura aquosa ácida em equilíbrio estável e quaternário de ácido acético, peróxido de hidrogénio, ácido peracético e água (Block, 2016; Block *et al.*, 2015; Chhetri *et al.*, 2014, 2016, 2017; Dell'Erba *et al.*, 2007; Eckert e Eckert, 2013; Luukkonen e Pehkonen, 2016; Luukkonen *et al.*, 2014; McFadden *et al.*, 2017; Santoro *et al.*, 2007). As concentrações de ácido peracético, ingrediente activo responsável pela capacidade desinfetante, são, tipicamente, entre 5 e 15 % p/p (Leverenz, 2006; Luukkonen e Pehkonen, 2016; Luukkonen *et al.*, 2014); 25% p/p de peróxido de hidrogénio e até 35% p/w de ácido acético e o restante em água (Santoro *et al.*, 2007).

Os produtos da degradação do PAA são o ácido acético (vinagre), peróxido de hidrogénio e água (Block *et al.*, 2015; Chhetri *et al.*, 2014, 2016, 2017; Santoro *et al.*, 2007); por sua vez o ácido acético é biodegradável em dióxido de carbono, enquanto o peróxido de hidrogénio degrada-se em água e oxigénio - compostos atóxicos para os organismos aquáticos (Chhetri *et al.*, 2014, 2016, 2017; Silva, 2010), podendo, também, originar alguns ácidos carboxílicos inócuos (Santoro *et al.*, 2007)

O PAA é um oxidante relativamente forte (McFadden *et al.*, 2017), com potencial de redução (1,81 V) superior ao do cloro (1,57 V), mas inferior ao do ozono (2,07 V) (Bhatt, 2016). Na Tabela 14 são apresentadas algumas das características físicas e químicas do PAA.

Tabela 14 - Características físico-químicas do PAA.

Fórmula molecular	C ₂ H ₄ O ₃
Aparência	Líquido límpido incolor
Odor	Ácido acético pungente característico
pH (aparente)	1,0
pK_a	8,2
Densidade	1,07 a 1,13 g/mL
Viscosidade	3,280 cp
Solubilidade	Miscível em água em qualquer proporção

Este desinfetante é comburente (Silva, 2010), termodinamicamente instável e tem a capacidade de se decompor espontaneamente ou explodir quando altamente concentrado, aquecido, sob tensão mecânica ou exposto aos efeitos catalíticos das impurezas (Luukkonen e Pehkonen, 2016). Este oxidante é também corrosivo, afectando aço, cobre, latão, bronze e ferro galvanizado e pode afectar vinil e borracha, pelo contrário vidro, fibras óticas, aço inoxidável, alumínio puro e alguns plásticos (PVC, PP, PE) são resistentes ao PAA (Leverenz, 2006; Silva, 2010). Por uma questão de segurança e estabilidade, a temperatura de armazenamento recomendada é inferior a 30 °C e deve ser armazenado nos recipientes originais (Kitis, 2004; Luukkonen e Pehkonen, 2016); as concentrações de PAA comerciais não ultrapassam os 15% devido à sua instabilidade e tendência explosiva (Leverenz, 2006; Santoro *et al.*, 2007; Silva, 2010); no entanto, soluções mais concentradas são utilizadas na indústria (Leverenz, 2006).

Para a utilização do PAA, é recomendável a utilização de equipamento de proteção individual (EPI) e em locais ventilados (Silva, 2010), uma vez que a exposição a este desinfetante causa irritação e possivelmente danos permanente na pele (enfisema cutâneo), olhos e sistema respiratório (Luukkonen e Pehkonen, 2016). Em contacto com a pele, em exposições de curto a médio prazo, considera-se para concentrações sem efeito, 0,2%; em concentrações no ar inferiores a 0,16 -0,17 ppm observa-se que quando inalado, não causa irritação, no entanto, concentrações mais elevadas são nocivas e susceptíveis de provocar asma ocupacional (Luukkonen e Pehkonen, 2016).

O PAA tem sido amplamente utilizado como desinfetante e esterilizante em várias indústrias (Block *et al.*, 2015; Eckert e Eckert, 2013), nomeadamente na indústria alimentar e processamento de bebidas, carnes, enlatados, lacticínios, vinhos, cerveja, cosméticos, indústria farmacêutica, têxtil, de celulose e papel, e em cuidados de saúde, nomeadamente em desinfeção hospitalar (Bhatt, 2016; Kitis, 2004; Luukkonen e Pehkonen, 2016; Luukkonen *et al.*, 2014).

A indústria alimentar é o maior usuário deste composto, uma vez que reduz os microrganismos presentes em equipamento e instrumentos de processamento de alimentos (Luukkonen e Pehkonen, 2016; Silva, 2010). Na área da saúde, o PAA é utilizado na esterilização de endoscópios e desinfeção de superfícies hospitalares e na indústria do papel é utilizado como agente de branqueamento (Luukkonen e Pehkonen, 2016).

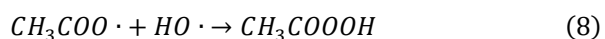
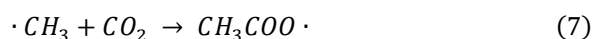
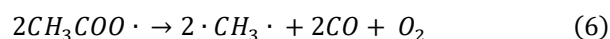
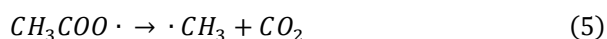
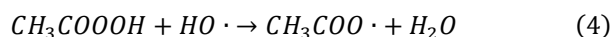
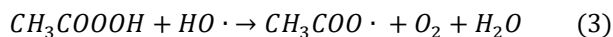
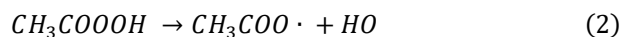
A alta eficiência do PAA em termos bactericida, virucida, fungicida e esporicida mostradas nestas indústrias e baixos impactes ambientais, levou a considerar o uso do PAA como desinfetante de efluentes de águas residuais (Kitis, 2004; Dibo Liu *et al.*, 2017).

O mecanismo de desinfeção do PAA ainda não é totalmente conhecido (McFadden *et al.*, 2017), no entanto alguns estudos sugerem que este processo ocorre pela libertação de radicais hidroxílicos (Karpova *et al.*, 2013; Luukkonen e Pehkonen, 2016; McFadden *et al.*, 2017; Santoro *et al.*, 2007).

Assim, a desinfeção da AR e a oxidação dos poluentes aquosos baseia-se na formação de espécies de oxigénio altamente reactivas (ROS), tais como o radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), o anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroperoxilo ($\text{HO}_2\cdot$), acilo e radicais perácidos (Karpova *et al.*, 2013; Luukkonen e Pehkonen, 2016).

Estas espécies são fortes oxidantes, proporcionando um efeito antimicrobiano eficiente e a oxidação da matéria orgânica (através de oxidação, hidrólise, desnaturação ou substituição) (Karpova *et al.*, 2013; Silva, 2010).

A formação dos radicais referentes ao PAA é apresentada pelas equações 2 a 8 (Luukkonen e Pehkonen, 2016).



O primeiro passo, representado pela equação 2, requer a ativação da reação por parte de um catalisador, como por exemplo, um metal de transição, radiação UV ou carbono ativado (Luukkonen e Pehkonen, 2016).

Globalmente, os radicais produzidos contribuem para a oxidação, no entanto, o HO•, CH₃COO• e em menor grau o •CH₃, são sugeridos como os mais importantes (Luukkonen e Pehkonen, 2016). Os radicais orgânicos apresentam uma meia-vida (*half-life*) superior à do HO•, levando a querer que possam ser mais eficazes na ação antimicrobiana (Karpova *et al.*, 2013; Luukkonen e Pehkonen, 2016). Contudo, a difusão do HO• é mais demorada que a sua meia-vida (*half-life*), permitindo a sua reação com macromoléculas oxidáveis (carboidratos, ácidos nucleicos, lípidos e aminoácidos) (Luukkonen e Pehkonen, 2016).

Os ROS libertados conseguem alterar o metabolismo dos microrganismos e danificar a estrutura das células microbianas, através de reações em cadeia com biomoléculas, enzimas, lípidos, proteínas estruturais e ADN (Karpova *et al.*, 2013; Silva, 2010). A concentração de espécies de oxigénio precisa de ser superior à concentração de antioxidantes das células (mecanismos de defesa contra ROS) para se obter uma desinfeção eficaz (Karpova *et al.*, 2013).

Segundo Luukkonen e Pehkonen (2016) e Silva (2010), os danos causados por PAA numa célula viva e que podem resultar na morte dos microrganismos, baseiam-se sobretudo em:

- Oxidação de sulfidril (-SH), dissulfureto (S-S) e duplas ligações de proteínas, enzimas e outras biomoléculas;
- Inativação da enzima catalase, peroxidase e de outras enzimas responsáveis por processos metabólicos;
- Desnaturação de proteínas;
- Interrupção da quimiosmose que ocorre na membrana citoplasmática;

- Danos na parede celular, que proporciona rigidez e resistência mecânica aos microrganismos e permite alguns processos fisiológicos;
- Bases da molécula de ADN com efeitos adversos.

Especula-se que a parte orgânica da molécula do perácido consegue ajudar os ROS a penetrar as células microbianas e que é possível uma reação direta entre o perácido e a molécula alvo (Luukkonen e Pehkonen, 2016).

Tal como para outros desinfetantes, na desinfecção de AR com PAA, as dosagens, tempo de contacto e eficiência do processo variam consoante a qualidade da água, o organismo alvo e do nível de inativação necessário (Cavallini *et al.*, 2013; Leverenz, 2006; McFadden *et al.*, 2017; Santoro *et al.*, 2007); a temperatura, o pH, a natureza e concentração de matéria orgânica, os sólidos suspensos totais (SST) e a CBO são os parâmetros identificados que podem influenciar o desempenho do PAA (Eckert e Eckert, 2013).

O PAA é eficaz numa ampla gama de temperaturas (entre 0 e 100 °C), contudo, com o aumento da temperatura da água também as eficiências de desinfecção aumentam (Kitis, 2004; Luukkonen *et al.*, 2014).

Relativamente ao pH, este oxidante é mais eficaz em condições ácidas - a pH alcalinos (pH>9) a eficiência de desinfecção começa a diminuir, uma vez que a forma dissociada (CH_3COOO^-) é predominante e menos ativa que a forma não dissociada (CH_3COOOH), considerada o biocida do PAA (Kitis, 2004; Luukkonen *et al.*, 2014).

Em termos de matéria orgânica, uma carga elevada pode levar à necessidade de um aumento da dose aplicada (Luukkonen *et al.*, 2014), com Eckert e Eckert (2013) referindo que a presença de matéria altamente orgânica conseguir interferir nas capacidades de desinfecção do PAA.

A presença de metais de transição pode iniciar a decomposição catalítica e a formação de radicais de PAA e peróxido de hidrogénio, intensificado a desinfecção no caso do mecanismo de desinfecção por radicais (Luukkonen *et al.*, 2014).

O efeito da quantidade e tamanho das partículas de AR na desinfecção de PAA é um assunto relativamente desconhecido (McFadden *et al.*, 2017), no entanto a presença de SST parece estar inversamente relacionada com a eficiência de desinfecção, ou seja, esta eficiência aumenta com a diminuição dos SST, assim como com a diminuição da CBO (Kitis, 2004).

Apesar disto, o poder de desinfecção não é influenciado por sólidos suspensos até os 100 mg.L⁻¹ mostrando eficiências elevadas; em águas com SST > 100 mg.L⁻¹ também foram atingidos bons níveis de desinfecção (Kitis, 2004; McFadden *et al.*, 2017; Santoro *et al.*, 2007).

Como desinfetante em águas residuais, o PAA é considerado eficaz apresentando um desempenho de desinfecção semelhante a outros processos de desinfecção utilizados atualmente (Eckert e Eckert, 2013); por exemplo, para um mesmo nível de desinfecção as doses necessárias de PAA e Cl₂ foram de 2 e 8 mg.L⁻¹, respetivamente, sendo os valores correspondentes de CT para o PAA e o Cl₂ de 20 e 80 mg/min.L⁻¹, respetivamente (Karpova *et al.*, 2013).

Kitis (2004) refere vários estudos de remoção de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* (E.coli) onde se obteram 3,0 a 5,0 log de redução para doses de PAA utilizadas entre 5,0 e 10,0 ppm; por sua vez Eckert e Eckert (2013), afirmam que com o uso de PAA em várias ETAR obtiveram reduções de 2,0 a 4,0 log de coliformes fecais após dosagens de 1,0 e 10,0 ppm, com tempos de contacto entre 5 e 60 minutos.

Segundo Luukkonen e Pehkonen (2016), para a desinfecção de efluentes secundários com PAA, as doses e os tempos de contacto necessários variam entre 0,6 e 10 mg/L e 10 e 60 min, respetivamente. Leverenz (2006) afirmou ainda que para uma dosagem de PAA de 5 mg/L e tempo de contato de 10 minutos se conseguiu uma remoção de 4 a 5 log de coliformes fecais e totais em efluentes secundários.

Para efluentes terciários, as doses de PAA variam entre 1,5 e 15 mg/L e os tempos de contacto entre 10 e 36 minutos (Luukkonen e Pehkonen, 2016); uma concentração de PAA de 2 mg/L mostrou, aproximadamente, uma redução de 2 log nas concentrações de coliformes fecais em efluentes terciários (Santoro *et al.*, 2007).

Em efluentes terciários, tempos de contato de 10 a 15 min e doses entre 1,5 e 2 mg/L, pareceram ser suficientes para a remoção de bactérias, enquanto que, doses na mesma ordem de grandeza, mas com tempos de contato de 60 min, conseguiram remover “*coliphage virus*” (Luukkonen *et al.*, 2014).

O PAA demonstrou eficácia na desinfecção de coliformes totais, contra os ovos helmintos (apesar da necessidade de doses relativamente elevadas) e na inativação de *Escherichia coli* e *MS-2 coliphage* (Luukkonen *et al.*, 2014; Santoro *et al.*, 2007), no entanto foi ineficaz na inativação de *Giardia* e *Cryptosporidium parvum*, poliovírus, ecovírus e coxsackie vírus (Santoro *et al.*, 2007).

Considera-se assim que o PAA é um desinfetante não convencional, que poderá ser uma alternativa ao cloro e que tem, na sua utilização, uma expectativa de ser ambientalmente amigável (McFadden *et al.*, 2017) e por isso, não promover a formação de subprodutos da desinfecção prejudiciais ao ecossistema aquático após reação com a água residual e matéria orgânica natural (Bhatt, 2016; Block *et al.*, 2015; Dell’Erba *et al.*, 2007; Eckert e Eckert, 2013;McFadden *et al.*, 2017; Ragazzo *et al.*, 2017; Santoro *et al.*, 2007; Silva, 2010).

Eckert e Eckert (2013) e Silva (2010) estudaram a aplicação de PAA em águas tratadas e a possível formação de trihalometanos (clorofórmio, bromofórmio, diclorobromometano e dibromoclorometano) e em ambos os estudos se verificou que a formação destes produtos era inexistente ou em quantidades insignificantes quando comparadas com a quantidade produzida após a desinfecção com cloro e posterior descloração.

No entanto alguns estudos relatam a formação de aldeídos e de compostos orgânicos bromados (Dell’Erba *et al.*, 2007; Luukkonen *et al.*, 2014; Ragazzo *et al.*, 2017; Santoro *et al.*, 2007).

Os aldeídos formar-se-ão a partir da transformação e/ou oxidação de aminoácidos, fenóis e outras substâncias aromáticas após interação com PAA em águas residuais tratadas (Santoro *et al.*, 2007). São considerados hepatotóxicas em concentrações elevadas (mg.L⁻¹), mas em concentrações na ordem dos µg.L⁻¹ não são esperados efeitos tóxicos (Dell’Erba *et al.*, 2007; Santoro *et al.*, 2007); no entanto o PAA tende a oxidá-los ainda mais, em ácidos carboxílicos e eventualmente em dióxido de

carbono (Luukkonen *et al.*, 2014). O potencial electroquímico do PAA permitiu oxidar o brometo em ácido hipobromático, no entanto, este pode ser rapidamente eliminado por estruturas orgânicas semelhantes ao fenol e formar fenóis bromados (Dell'Erba *et al.*, 2007; Santoro *et al.*, 2007).

Apesar da utilização do PAA estar a aumentar, ainda existe escassez de informação sobre a toxicidade dos efluentes tratados com PAA e possíveis subprodutos (da Costa *et al.*, 2014). Assim, devem ser realizados estudos mais aprofundados no sentido de perceber se existe, ou não, a formação de possíveis subprodutos e toxicidade do PAA, de modo a garantir a utilização deste oxidante (Cavallini *et al.*, 2013; Eckert e Eckert, 2013).

Na Tabela 15, são apresentadas as vantagens e desvantagens do PAA enquanto desinfetante.

Tabela 15 - Vantagens e desvantagens da utilização do PAA. Fonte: (Bhatt, 2016; Eckert e Eckert, 2013; Kitis, 2004; Leverenz, 2006; McFadden et al., 2017; Silva, 2010).

Vantagens	Desvantagens
Elevada ação sanitizante, antimicrobiana e amplo espectro de ação	Aumento do conteúdo orgânico do efluente
Baixo efeito residual e toxicidade	Menor eficiência de desinfecção contra alguns vírus e parasitas, por ex.: <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i>
Custos reduzidos na conversão de instalações de tratamentos existentes	Custo financeiro do produto e produção em baixa escala devido ao uso limitado
Ausência de níveis significativos de subprodutos nocivos após reação com AR ou matéria orgânica natural	Irritante à pele e mucosas
Ação e decomposição rápidas exigindo reduzidos tempos de contacto	Requer cuidado no manuseio
Concentração facilmente determinada	Necessidade de EPI (roupas protectoras, luvas de PVC, máscaras c/ filtro contra gases tóxicos e proteções oculares)
Baixa concentração de uso e praticamente inócuo na forma diluída	

Segundo Kitis (2004), a principal desvantagem na utilização do PAA como desinfetante é o elevado custo associado, resultado da sua ainda reduzida utilização. O custo do produto químico do PAA, é aproximadamente o dobro do custo do hipoclorito de sódio (Chhetri *et al.*, 2014) e quase dez vezes maior que o custo do cloro gasoso (Luukkonen e Pehkonen, 2016).

O custo de desinfecção de águas residuais municipais tratadas com PAA foi estimado em 0,0200 – 0,0645 €/m³ (Luukkonen e Pehkonen, 2016). Segundo Collivignarelli *et al.* (2000), citado por Luukkonen e Pehkonen (2016), os custos de investimento em sistemas de desinfecção de águas residuais biologicamente tratadas são, do maior custo para o menor, UV > Ozono > PAA > Dióxido de cloro.

A análise do custo de desinfecção com PAA depende de vários fatores, nomeadamente da qualidade microbiana exigida na descarga, a disponibilidade de produtos químicos e as propriedades físico-químicas da água residual a desinfetar e da concentração de substância activa de PAA (Luukkonen e Pehkonen, 2016).

4.6. Métodos analíticos para a determinação de EDC

4.6.1. Método de extração: SBSE

O processo analítico que permite a determinação de contaminantes a níveis vestigiais compreende as etapas de amostragem, preparação da amostra, análise e avaliação dos dados obtidos. As referidas etapas afetam de diferentes formas o ambiente, com níveis de poluição distintos sendo que a preparação da amostra é considerada o passo mais poluente de todo o processo analítico e também o mais importante (Aufartová *et al.*, 2011).

A preparação da amostra apresenta uma importância proporcional à complexidade da amostra e aumenta quando a concentração dos analitos a determinar se encontra em níveis vestigiais (Camino-Sánchez *et al.*, 2014). Esta etapa abrange procedimentos de limpeza, pré-concentração e extração destinados a melhorar a sensibilidade, especificidade e seletividade dos métodos analíticos (Iparraguirre *et al.*, 2011; Camino-Sánchez *et al.*, 2014).

Para extrair e pré-concentrar os analitos a observar é necessária a utilização de solventes orgânicos que permitem enriquecer os compostos alvo e a eliminação de potenciais interferências (Aufartová *et al.*, 2011).

Tendo como objetivo a miniaturização na preparação da amostra, nomeadamente a redução ou mesmo remoção do consumo de solventes (química verde), redução do volume de amostras e do tempo de análise e considerando uma melhoria da sensibilidade global do método analítico, técnicas como SBSE, SPME, SLM e LPME, têm ganho importância e substituído técnicas tradicionalmente aplicadas na preparação de amostras e de maior consumo de solventes, tal como LLE ou SPE (Iparraguirre *et al.*, 2011; Aufartová *et al.*, 2011; Camino-Sánchez *et al.*, 2014; Pintado-Herrera *et al.*, 2014; Aparicio *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, um elevado número de novas aplicações analíticas com SBSE têm sido propostas nomeadamente para extração de compostos naturais, poluentes e outros compostos orgânicos em matrizes ambientais, amostras biológicas, produtos farmacêuticos e alimentos (Camino-Sánchez *et al.*, 2014).

A técnica de microextração SBSE foi introduzida por Baltussen *et al.* (1999) no final da década de 1990, como uma nova e melhorada técnica de preparação de amostras (Aufartová *et al.*, 2011; Camino-Sánchez *et al.*, 2014; Nollet e Lambropoulou, 2017; Aparicio *et al.*, 2017).

No processo SBSE é utilizada uma barra de agitação magnética (encapsulada com vidro, com 10 a 20 mm de comprimento), habitualmente revestida com 25 -125 µL de PDMS com uma espessura de 0,3 – 1,0 mm (Figura 9) (Huang *et al.*, 2008; Queiroz, 2009; Nogueira, 2015).

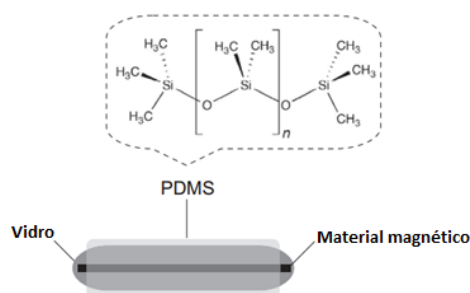


Figura 9 - Barra de agitação utilizada na extração com SBSE/PDMS. Fonte: (Nogueira, 2015)

O PDMS consiste numa fase polimérica, não polar, inerte, com propriedades de difusão peculiares e termicamente estável (permite a aplicação das barras numa ampla gama de temperaturas), apresentando facilidade e a possibilidade de rastrear e identificar os produtos da sua degradação. É um líquido de alta viscosidade que promove interações hidrofóbicas com os compostos alvo, sendo que o processo de adsorção ocorre principalmente através de forças de Van-der-Waals (Nogueira, 2015; Aparicio *et al.*, 2017; Wooding *et al.*, 2017).

Assim, as barras revestidas com PDMS são consideradas elementos móveis de sorção em que todo o seu volume está envolvido na extração analítica e não apenas a área superficial da fase de extração (Spietelun *et al.*, 2013; Iparraguirre *et al.*, 2011).

A utilização deste polímero possibilita a minimização do volume e manipulação da amostra, assim como de solventes orgânicos, atingindo limites de deteção menores em comparação com outras técnicas mais convencionais (Pintado-Herrera *et al.*, 2014).

Os princípios teóricos e condições de influência desta técnica baseiam-se na técnica de extração SPME, consistindo num processo de sorção dos compostos ao revestimento da barra de SBSE através da introdução deste dispositivo em amostras aquosas (Nollet e Lambropoulou, 2017; Nogueira, 2015; Camino-Sánchez *et al.*, 2014).

A eficiência das SBSE está correlacionada com o coeficiente de partição do soluto entre as fases presentes no sistema analítico (fase PDMS e fase da amostra); com o carácter hidrofóbico do soluto ($\log K_{ow}$); com o volume da amostra e com as dimensões da barra (Almeida e Nogueira, 2006; Queiroz, 2009; Iparraguirre *et al.*, 2011; Nogueira, 2015).

Considerando as características do PDMS e o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) sabe-se que para compostos não polares ($\log K_{ow} \geq 3$, ou seja altamente hidrofóbicos), maior será o rendimento de extração das SBSE (Nogueira, 2015; Wooding *et al.*, 2017). Em contrapartida, para a extração de compostos polares ($\log K_{ow} < 3$), o PDMS apresenta taxas de recuperações reduzidas, não sendo adequado para este tipo de compostos (Wooding *et al.*, 2017; Aparicio *et al.*, 2017).

Os princípios em que se baseia o método SBSE mostram que para baixos volumes de amostra maior será a capacidade de recuperação (%) do composto. No entanto, para compostos não polares, o

aumento da quantidade extraída do composto alvo é proporcional ao aumento do volume de amostra (Queiroz, 2009; Camino-Sánchez *et al.*, 2014; Nogueira, 2015).

O processo de extração ocorre através da imersão da barra de agitação na amostra (modo de amostragem de imersão) ou através do modo de amostragem de *headspace* (HS), sendo este último utilizado maioritariamente para compostos voláteis. Posteriormente, a barra é removida e enxaguada com água Milli-Q e seca. Após a sorção, ocorre a dessorção dos solutos da fase polimérica por dessorção térmica (TD) ou por dessorção líquida (LD) (Queiroz, 2009; Spietelun *et al.*, 2013; Camino-Sánchez *et al.*, 2014; Nogueira, 2015; Nollet e Lambropoulou, 2017).

Na Tabela 16 são apresentadas as vantagens da técnica de SBSE.

*Tabela 16 - Vantagens da técnica SBSE Fonte: (Pintado-Herrera *et al.*, 2014; Camino-Sánchez *et al.*, 2014; Nogueira, 2015; Nollet e Lambropoulou, 2017).*

Vantagens
Sensibilidade elevada, precisão e boas recuperações
Capacidade de atingir níveis vestigiais, diminuindo os limites de deteção
Simplificação e rapidez no manuseamento da amostra
Diminuição do volume de amostra
Reutilização das barras
Económico (eliminação ou redução do uso de solventes orgânicos)
Possibilidade de operar sem requisitos especiais, por ex.: durante a noite
Ampla gama de aplicações

A principal desvantagem das SBSE é a baixa recuperação de compostos polares, uma vez que as ligações hidrofóbicas com o PDMS são fracas (Camino-Sánchez *et al.*, 2014; Wooding *et al.*, 2017).

4.6.2. Método de deteção: HPLC-DAD

Os EDC encontram-se no ambiente em matrizes complexas e em baixas concentrações. Assim, e devido à sua complexidade química (constituídos por uma mistura de compostos de várias classes e com diferentes propriedades químicas) a sua determinação torna-se um desafio analítico (Nollet e Lambropoulou, 2017).

A determinação destes compostos em diferentes matrizes requer a utilização de técnicas com elevada sensibilidade, seletividade, altamente eficientes e rápidas (Singh *et al.*, 2014; Nollet e Lambropoulou, 2017).

A determinação de desreguladores endócrinos é principalmente realizada por métodos cromatográficos, cromatografia líquida (LC) ou cromatografia gasosa (GC), utilizando diferentes detetores (Singh *et al.*, 2014). Estas técnicas apresentam-se como as mais adequadas para a determinação destes compostos em amostras ambientais, como por exemplo, águas residuais (Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010).

A utilização dos métodos cromatográficos em detrimento de outras técnicas deve-se à sua capacidade de identificação de analitos individuais de interesse (Almeida e Nogueira, 2006).

Segundo Jiang *et al.* (2015), a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é a técnica mais utilizada para determinação e monitorização de EDC, nomeadamente hormonas esteróides.

Embora o GC, como método de determinação de hormonas, seja mais popular que o HPLC, esta última técnica de cromatografia apresenta vantagens sobre a primeira, nomeadamente robustez, versatilidade, flexibilidade e simplicidade na preparação da amostra. O que permite a determinação de certos compostos, como o estriol e conjugados, assim como, a determinação da decomposição de alguns compostos, como por exemplo a decomposição do EE2 em estrona (E1). Determinações que o GC não tem capacidade para efetuar, uma vez que necessita de derivatização da amostra, o que não acontece com a técnica de LC (Almeida e Nogueira, 2006; Huang *et al.*, 2008; Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010; Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Locatelli *et al.*, 2016).

Os benefícios enunciados permitiram que ao acoplar o HPLC com o método de deteção de espectrometria de massa (MS) ou detetores óticos, a técnica de LC tenha ganho vantagem sobre a técnica de GC (Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Locatelli *et al.*, 2016).

Para além do MS, outros detetores podem ser utilizados para análise destes compostos, como absorção de ultravioleta visível (UV-Vis) e fluorescência (FLD) (Jiang *et al.*, 2015). Devido à sensibilidade limitada, poucos são os estudos em que se aplicaram outros detetores acoplados ao HPLC (Locatelli *et al.*, 2016).

Contudo, na literatura é referida a utilização de DAD (Deteção por Fotodíodos ou Diode Array) para determinação de estrogénios naturais e sintéticos, uma vez que estes compostos possuem grupos de cromóforos que permitem a determinação de uma gama de comprimentos de onda específicos, ~197-200 nm (Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2010; Locatelli *et al.*, 2016).

A cromatografia líquida tem como principal objetivo a separação individual de espécies químicas distintas constituintes de uma mistura complexa; ocorrendo por meio de uma interação seletiva entre as moléculas da amostra e de duas fases, uma estacionária e outra móvel (Chust, 1990; Fernandes, 2016; Silva, 2016).

Os principais componentes de um sistema HPLC (Figura 10) são um sistema de bombas de alta pressão, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detetor e um computador, que apresente um *software* capaz de processar os dados recebidos do detetor.

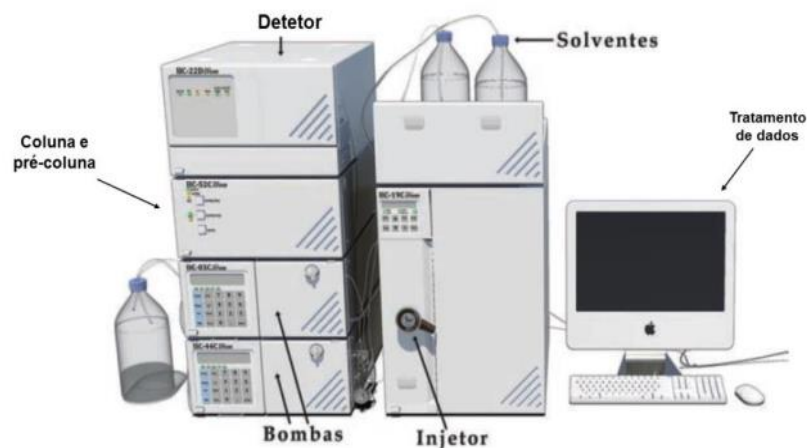


Figura 10 - Componentes básicos de um equipamento HPLC. Fonte: (Fernandes, 2016).

O sistema de bombas permite a circulação da fase móvel através de todo o sistema cromatográfico com um determinado fluxo. O fluxo pode ser programado de modo a introduzir os componentes da fase móvel em proporções variáveis, eluição em gradiente, ou a uma proporção constante, eluição isocrática (Silva, 2016).

O sistema de injeção permite a entrada da amostra no sistema, que é arrastada pela fase móvel através da coluna cromatográfica (Silva, 2016).

A coluna cromatográfica consiste num cilindro rígido, com um enchimento formado por pequenas partículas no seu interior, correspondendo à fase estacionária do sistema; a fase móvel neste método cromatográfico é líquida, conferindo o nome a esta técnica (Chust, 1990; Fernandes, 2016).

Os elementos presentes na amostra, devido às suas distintas propriedades, apresentam distintos graus de “afinidade” com as fases estacionária e móvel e por conseguinte as suas velocidades de migração serão igualmente distintas, o que irá permitir o desenvolvimento da separação cromatográfica. Conclui-se então que o elemento com maior “afinidade” com a coluna é aquele que elui por último, enquanto que aquele que elui em primeiro lugar será o elemento com menor “afinidade” com a fase estacionária (Chust, 1990; Silva, 2016).

Considerando a polaridade das fases de separação, a separação pode dar-se por fase normal ou por fase reversa. Na fase normal, a fase estacionária é polar (normalmente o enchimento é composto de sílica) e a fase móvel apolar; permitindo que os compostos polares fiquem retidos mais tempo na coluna enquanto que os restantes, com menor polaridade e como tal com maior afinidade com a fase móvel, são eluídos mais rapidamente da coluna. Em comparação, a fase reversa apresenta a fase estacionária apolar e a fase móvel polar, levando a que os elementos menos polares fiquem retidos na coluna (Silva, 2016).

Após a coluna, os elementos seguem para o detetor, que regista as diferentes variações de sinal das concentrações dos elementos separados anteriormente. O sinal potenciometro emitido pelos detetores

de HPLC é armazenado e analisado por um *software* instalado num computador, que converte o sinal do detetor num cromatograma (Chust, 1990; Fernandes, 2016; Silva, 2016).

A partir do cromatograma é possível obter a área do pico, através da qual é possível determinar a concentração do composto e o tempo de retenção dos componentes da amostra, que permite identificar o elemento pretendido (Fernandes, 2016; Silva, 2016).

4.7. Bioensaio

Os ensaios biológicos são úteis na determinação de atividades mediadas por recetores em amostras ambientais contendo um composto ou misturas complexas de contaminantes, sendo utilizados para identificar se o contaminante ou conjunto deles apresenta efeitos prejudiciais para os organismos; determinando, com modos de ação específicos (biomarcadores), a contaminação por poluentes sem analisar diretamente os compostos individualmente em amostras ambientais (Hong, 2012; Wang *et al.*, 2009).

Os bioensaio são técnicas que oferecem soluções rápidas, sensíveis e relativamente baratas considerando algumas das limitações de análise instrumental (Wang *et al.*, 2009).

Os bioensaio *in vivo* permitem avaliar a gravidade, o tempo e a dependência da dose dos efeitos tóxicos nos organismos e comunidades padrão e não padronizados (Prasse *et al.*, 2015).

Os biomarcadores identificam-se por ser quaisquer respostas biológicas induzidas por exposições a xenobióticos, avaliadas num nível sub-individual, tanto no interior do organismo (enzimas, aminoácidos, hormonas, proteínas e material genético) como nas suas excreções (urina, fezes), demonstrando uma alteração relativamente às condições normais detetadas em organismos não expostos (Reis Filho *et al.*, 2006).

A presença de diferentes contaminantes provoca nos organismos expostos stress oxidativo, que resulta num aumento da produção de oxigénio reativo (ROS) relativamente à formação de agentes de defesa antioxidante (Diniz *et al.*, 2015; Madeira *et al.*, 2016). Como resposta à formação destas espécies oxidativas prejudiciais às células dos organismos, estes apresentam mecanismos de defesa antioxidativos, que permitem manter os componentes essenciais da célula e minimizar os efeitos nocivos do ROS (Diniz *et al.*, 2015; Karpova *et al.*, 2013).

Estes mecanismos traduzem-se na formação de enzimas antioxidantes, que neutralizam e degradam os ROS, como por exemplo a catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e a peroxidase (Madeira *et al.*, 2016).

A CAT, considerada um biomarcador importante, é uma enzima antioxidante envolvida no processo de degradação de ROS, como por exemplo, o peróxido de hidrogénio e está presente na maioria das células aeróbias, e em grandes quantidades no fígado, rins e eritrócitos (Diniz *et al.*, 2015; Silva, 2016).

A GST é fundamental no processo de desintoxicação, estando presente principalmente no fígado dos mamíferos; pertence a um grupo de enzimas com elevada importância na biotransformação e

eliminação de certos poluentes, como os xenobióticos e apresenta a capacidade de defender o organismo do stress oxidativo (Huber *et al.*, 2008)

Por sua vez, a peroxidação lipídica (LPO) constitui um biomarcador importante em casos de stress oxidativo, uma vez que se define pela degradação de lípidos em caso de danos oxidativos nas membranas celulares na presença de ROS (Sun *et al.*, 2008). Da peroxidação lipídica resulta o Malondialdeído (MDA) que é muito sensível ao stress oxidativo e serve como bom indicador dos efeitos oxidativos nas células (Diniz *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2008).

A vitelogenina (VTG) é utilizada como biomarcador para deteção de desregulação endócrina (Baumann *et al.*, 2014). A VTG é uma fosfoproteína, principal precursora da proteína da gema em vertebrados ovíparos e é normalmente sintetizada pelo fígado em resposta a estrogénios endógenos (Diniz *et al.*, 2010; Diniz *et al.*, 2005). Esta proteína normalmente é induzida em fêmeas maduras durante a oogénese, estando ausente ou presente em concentrações muito baixas nos peixes machos e juvenis. No entanto, em ambos é detetada a síntese de VTG aquando da presença de estrogénios ou xenoestrogénios, fazendo deste um biomarcador de exposição estrogénica para peixes machos e juvenis (Diniz *et al.*, 2010, 2005; Hong, 2012).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um modelo biológico de pesquisa reconhecido em estudos de genética molecular e desenvolvimento biológico, e é referenciado como modelo valioso e ideal em estudos toxicológicos (Diniz *et al.*, 2015), por apresentar um curto período de geração, fácil manutenção e alojamento, alta fecundidade, desenvolvimento rápido e dimensões pequenas, o que permite avaliar o ciclo de vida total ou parcialmente (Baumann *et al.*, 2014; Diniz *et al.*, 2015; Luzio *et al.*, 2016), permitindo, seguindo normas padronizadas e pré-estabelecidas nos ensaios, extrapolar os resultados para espécies superiores, nomeadamente o Homem (Silva, 2016).

5. Plano Experimental

Considerando os objetivos propostos para o presente estudo foi definido um Plano experimental onde se apresentam as diferentes etapas efetuadas durante o trabalho laboratorial.

Tabela 17 - Plano experimental detalhado.

<i>Etapas</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Descrição</i>
<i>Ensaios preliminares</i>	Otimização do método	Elaboração de Curvas de Calibração através de: <ul style="list-style-type: none"> • Padrões diretos em água desmineralizada com EE2 a concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg.L⁻¹. (injeções triplicadas); • Padrões com a utilização do método SBSE, numa amostra de 250 mL em água desmineralizada com EE2 a concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg.L⁻¹. (injeções triplicadas). Determinação dos limites de deteção e quantificação.
<i>Ensaios complementares</i>	Caracterização da Água Residual	Análises físico-químicas: <ul style="list-style-type: none"> • pH; • CQO. Determinação de EE2 na Matriz Água Residual (presença de EE2): <ul style="list-style-type: none"> • Aplicação do método SBSE numa amostra de 250 mL de água residual sem adição de EE2 (injeções triplicadas).
<i>Ensaios com PAA</i>	Estudo da remoção de EE2 com adição de PAA	Ensaios laboratoriais com adição de PAA em Jar-test: <ul style="list-style-type: none"> • Avaliação das condições ótimas de desinfecção, nomeadamente tempos de contato e dosagens ótimas; • Avaliação da remoção de EE2 recorrendo aos métodos SBSE e HPLC-DAD.
<i>Ensaios Ecotoxicológicos</i>	Avaliação da toxicidade do EE2 e do PAA	Ensaios biológicos <i>in vivo</i> , com exposição do peixe zebra (<i>Danio rerio</i>) ao EE2 e ao PAA: <ul style="list-style-type: none"> • Determinação de biomarcadores de stress oxidativo (enzimas antioxidantes) • Determinação de biomarcadores de desregulação endócrina

O plano experimental definido decorreu ao longo de 7 semanas, num total de cerca de 50 dias, como esquematizado na Figura 11 (este período não contempla a adaptação às práticas laboratoriais).



Figura 11 - Cronograma do trabalho experimental desenvolvido.

Como se mostra na Tabela 17, o trabalho laboratorial incluiu várias etapas, sendo que as iniciais, “*Ensaio Preliminares*” e “*Ensaio Complementares*”, permitiram aumentar a informação relativa à matriz usada e otimizar o método analítico utilizado.

A terceira etapa do trabalho laboratorial correspondeu aos “*Ensaio com PAA*” (Tabela 18), que permitiram testar diferentes condições de tratamento e concluir sobre as eficiências de remoção de EE2, através da análise dos cromatogramas obtidos a partir do HPLC.

Tabela 18 - Resumo do procedimento experimental adotado para os ensaios com PAA.

Ensaio	Tempo de Contacto (min)	Matriz	Concentração de EE2 (µg/L)	Dosagens de PAA (mg/L)	Velocidade de Agitação (rpm)	Método de Extração	Método Analítico
1	10	ART ¹	50	1,5,10 e 15	200	SBSE-PDMS ³	HPLC-DAD ⁴
		AD ²					
2	15	ART ¹	50	1,5,10 e 15	200	SBSE-PDMS ³	HPLC-DAD ⁴
		AD ²					
3	20	ART ¹	50	1,5,10 e 15	200	SBSE-PDMS ³	HPLC-DAD ⁴
		AD ²					

¹ Água Residual Tratada; ² Água Desmineralizada; ³ Extração Sortiva em Barra de Agitação com revestimento em polidimetilsiloxano; ⁴ Cromatografia líquida de alta resolução com Detecção Diode Array.

A última etapa laboratorial consistiu nos “*Ensaio Ecotoxicológicos*” que permitiram avaliar o potencial de toxicidade do EE2, do PAA e ainda, permitiram estudar a capacidade do PAA em reduzir o poder estrogénico do EE2, através da avaliação de biomarcadores de toxicidade (glutathione-S-transferase, catalase, peroxidação lipídica) e de desregulação endócrina (vitelogenina). Nesta componente laboratorial foram realizados ensaios de exposição, como se mostra na Tabela 19.

Tabela 19 - Procedimento experimental adotado para os ensaios biológicos com peixe zebra (Danio rerio).

Tanque	Volume Água destilada (mL)	Volume de Solução a adicionar (mL)	Solução adicionada
1	10	5	-
2			Metanol
3			Solução de EE2 em metanol
4			Solução c/ EE2 tratada com PAA ¹
5			Solução com PAA ²

¹ Retirados 5 mL de um volume total de água destilada de 1 L com EE2, tratado com PAA no Jar-test com as condições de TC = 20 min e 15 mg.L⁻¹ de concentração de PAA; ² Solução em água desmineralizada com uma concentração de 2280 mg.L⁻¹

6. Materiais e Métodos

6.1. Materiais

6.1.1. Água Residual Urbana – Caso de estudo

A água residual (AR) utilizada durante os ensaios laboratoriais é proveniente da ETAR da Quinta do Conde, de onde se recolheram, cerca de 140 litros, no dia 3 de Maio de 2017.

A ETAR da Quinta do Conde faz parte do subsistema da Quinta do Conde, conjuntamente com as estações elevatórias de Casal do Sapo, Coina, Santa Margarida, Pinhal do General, Quinta do Conde e Azeitão assim como pelos respetivos emissários e condutas elevatórias (Silva, 2015).

Esta ETAR tem capacidade para tratar um caudal total, no ano horizonte de projeto, de 19.300 m³.dia⁻¹, o que corresponde a cerca de 94 000 habitantes equivalentes. A descarga do efluente tratado inerente à ETAR da Quinta do Conde é realizada no esteiro de Coina (Rio Tejo) (Leite, 2014).

O tratamento instalado na ETAR da Quinta do Conde é de nível terciário, incluindo as três fases de tratamento: líquida, sólida e gasosa e um sistema de reutilização de água. As três fases de tratamento incluem diferentes processos e operações, nomeadamente (Leite, 2014; Silva, 2015):

- Fase Líquida
 - Pré-tratamento: Gradagem Grossa, Tamisador e Desarenador/Desengordurador
 - Tratamento Primário: Decantação Primária Lamelar
 - Tratamento Secundário: Vala de Oxidação e Decantação Secundária
 - Desinfecção: Radiação Ultravioleta
- Fase Sólida
 - Espessamento Gravítico e Mecânico de Lamas (Mesas de espessamento)
 - Digestão Anaeróbia a Quente
 - Desidratação Mecânica (Centrífuga)
 - Gasómetro
 - Cogeração
- Fase Gasosa
 - Desodorização Química

Na Figura 12, é possível observar a disposição dos diferentes órgãos de tratamento na ETAR da Quinta do Conde.



Figura 12 - Representação esquemática da ETAR da Quinta do Conde. Fonte: (Leite, 2014).

A recolha das amostras realizou-se entre o tratamento secundário e a desinfecção. Após cada recolha, manteve-se a AR numa câmara frigorífica refrigerada a 3 °C.

Na Tabela 20 mostram-se as características da AR.

Tabela 20 - Características da Água Residual Urbana utilizada durante os ensaios laboratoriais.

CQO ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	66,79
pH	7,85

6.1.2. Material Utilizado

O material utilizado ao longo dos ensaios laboratoriais consistiu em:

Balanças

- Mettler Toledo AG 204, Max 210 g, d=0,1 mg;
- Kern 470-36m, Max 2000 g, Min 0,5 g, e=0,1 g, d=0,1 g, 0 °C/40 °C DC9V.

Composto 17 α -Ethinilestradiol marca *Sigma-Aldrich*, com a referência E4876-1G, com $\geq 98\%$ de pureza, CAS n.º 57-63-6, Mol Wt = 32,04 g.mol⁻¹.

Barras SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction), marca *Gerstel Twister* PDMS, tipo GC 011555-01-00, espessura do filme de 1 mm e comprimento da barra de 20 mm.

Sistema de filtração a vácuo

- Bomba de vácuo, marca *KNF Neuberger*, tipo N035AN.18, Motor IP20, com uma pressão funcionamento de 4 bar g;

- Filtros microfibras de vidro, marca *Filter-Lab*, porosidade 1,2 µm, diâmetro 47 mm, referência MFV3;
- Filtros de papel, marca *Macherey-Nagel*, porosidade 0,4 µm, diâmetro 45 mm, referência MN GF-5.

Sistema de HPLC

- Cromatógrafo, marca *Waters Alliance*, Separations Module, modelo 2690 de bomba quaternária;
- Detetor photodiode array, marca *Waters*, modelo 996;
- Coluna *Luna* 5 µm C18 (2) 100 Å, referência (OOF-4252-YO), tamanho LC, Column 150x3 mm;
- Pré-coluna C18, marca *Phenomenex*, KJ0-4282;
- Software *MassLynx* V4.0.
- Acrodiscs, marca *Whatman*, Anotop 10, porosidade 0,2 µm, diâmetro 10 mm, Cat. no. 6890 1022;
- Agitadores magnéticos, marca *JP Selecta*, tipo Agimatic-N;
- Potenciômetro, marca *WTW series InoLab*, modelo pH/ON 735;
- Sistema de Fluxo de Azoto alimentado por uma garrafa de azoto comprimido, marca *Alphagaz*, modelo AL 135369, n.º CE 231-783-9, pressão a 15 °C: 200 bar ± 5 %, Carga B10 1,9 m³, Carga B50 9,4 m³, Raccord C;
- Equipamento de ultrassons, marca *Julabo*, tipo USR 2/3, frequência 35 KHz;
- Sistema de aquecimento em banho de água, marca *SBS Instruments*, modelo a-160;
- Vortex, marca *Fisher Bioblock Scientific*, modelo Top-Mix 11118;
- Seringa, marca *Hamilton*, modelo Microliter Syringes, capacidade 250 µL;
- Jar-test, marca *Velp Scientific*, modelo FC6S, 10-300 rpm.

6.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados no decorrer do presente estudo foram:

- Acetonitrilo (CH₃CN), marca *Carlo Erba-Reagents*, EEC n.º 200-835-2, CAS n.º 75-05-8, MW (g.mol⁻¹) 41,05;
- Ácido Fórmico (HCOOH), marca *PanReac AppliChem*, concentração 98%, CAS n.º 64-18-6, MW (g.mol⁻¹) 46,03;
- Cloreto de sódio (NaCl), marca *Sigma-Aldrich*, CAS n.º 7647-14-5, MW (g.mol⁻¹) 58,44;
- Dimetilsulfóxido, DMSO (CH₃SOCH₃), marca *Carlo Erba-Reagents*, EEC n.º 200-664-3, CAS n.º 67-68-5, MW (g.mol⁻¹) 78,13.
- Metanol (CH₃OH), marca *Honeywell – Riedel-de Hain*, CAS n.º 67-56-1, MW (g.mol⁻¹) 32,04.

- Ácido Peracético (CH_3COOOH), marca *Merck KGaA*, concentração 37,5 - 40,5 %, densidade 1,14 kg.

6.2. Métodos

6.2.1. Solução Padrão de 17α -Ethinilestradiol

Considerando que ao longo dos ensaios seria necessário preparar soluções de diferentes concentrações de 17α -Ethinilestradiol e tendo em conta a perigosidade e capacidade de desregulação endócrina do EE2, preparou-se uma solução-mãe deste composto, em metanol. Para a preparação desta solução foram solubilizados 10 mg de EE2 num balão de 100 mL, resultando numa solução de concentração de 100 mg.L^{-1} . Assim, sempre que se pretendeu utilizar uma amostra com uma concentração diferente, recorreu-se à relação entre concentrações e volumes de diferentes soluções e obteve-se o volume a extrair da solução-mãe.

6.2.2. Preparação de brancos

Os ensaios em branco permitiram determinar corretamente as concentrações de EE2, verificar a presença de EE2 e verificar a expressão dos compostos na matriz analisada.

Assim sendo foram considerados os seguintes ensaios em branco e respetivos objetivos:

Tabela 21 - Ensaios em branco realizados e respectivos objetivos.

Ensaio	Objetivo	Condições
Branco c/ Água Desmineralizada e EE2	Determinar tempo de retenção de EE2	100 ppb de EE2
Branco c/ Água Desmineralizada e PAA	Verificação do comportamento do PAA, existência de subprodutos do PAA que possam interferir com a leitura	[PAA] = 15 mg.L^{-1} ; TC= 20 min
Branco c/ Água Residual	Verificação da existência de EE2 ou de algum composto que interfira com a determinação	-
Branco c/ Água Residual e EE2	Verificação da expressão do composto com a matriz (comportamento)	100 ppb de EE2
Branco c/ Água Residual e PAA	Verificação do comportamento do PAA numa matriz complexa, e existência de subprodutos que possam interferir com leitura	[PAA] = 15 mg.L^{-1} ; TC= 20 min

A preparação dos brancos foi realizada recorrendo ao método SBSE, seguindo o procedimento experimental apresentado no ponto 6.2.6. Para efeitos de análise, os cromatogramas foram observados no comprimento de onda de 281 nm.

6.2.3. Curva de Calibração recorrendo ao método SBSE

Com a elaboração da curva de calibração e através da respetiva equação da reta foi possível calcular a concentração de EE2 existente nas amostras utilizadas em cada ensaio. O cálculo das concentrações foi realizado tendo em conta as áreas dos picos constantes nos cromatogramas obtidos para cada ensaio, analisados no comprimento de onda de 281 nm.

Para a determinação das curvas de calibração, prepararam-se padrões em água desmineralizada com concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, como esquematizado na Figura 13. Na preparação dos padrões utilizou-se o método de extração e de deteção apresentados no ponto 6.2.6.

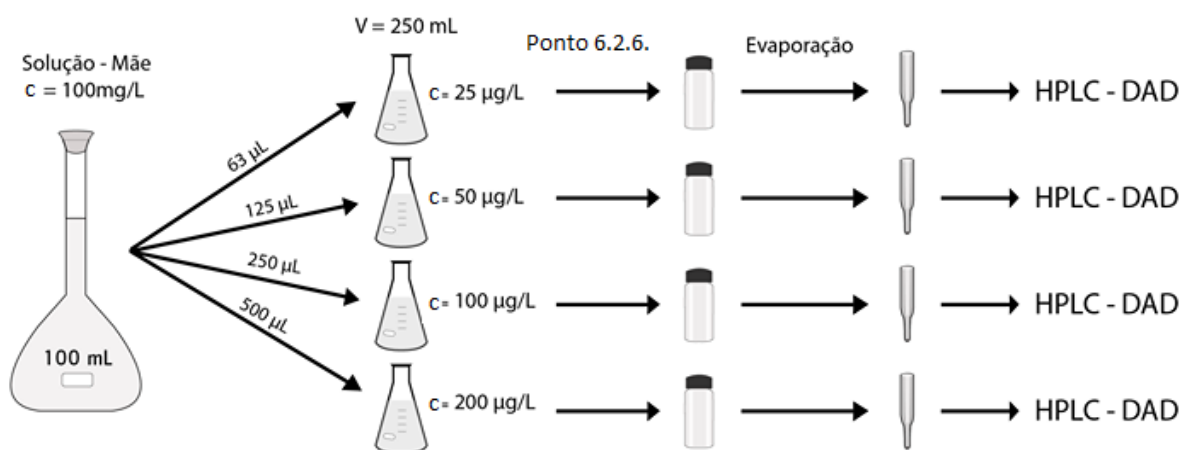


Figura 13 - Esquema representativo da preparação dos padrões da curva de calibração.

Com o objetivo de se conseguir detetar e quantificar concentrações de EE2 inferiores e facilitar a observação dos respectivos picos após a leitura em HPLC-DAD, foi realizada uma segunda curva de calibração, com padrões em água desmineralizada com concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que seguiu o procedimento apresentado no ponto 6.2.6. No entanto, na fase de secagem com azoto a solução proveniente de 4 erlenmeyers (1 L de solução) convergiu para um só vial com um insert de 200 μL , como apresentado na Figura 14.

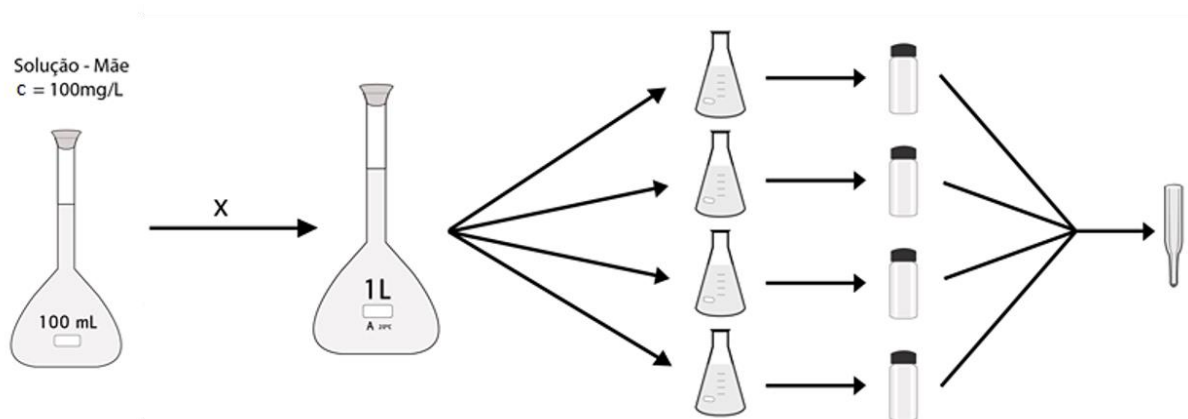


Figura 14 - Esquema representativo da preparação das curvas de calibração de 1 L. ($x = 250 \mu\text{L}$ para $25 \mu\text{g.L}^{-1}$, $500 \mu\text{L}$ para $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, 1 mL para $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, 2 mL para $200 \mu\text{g.L}^{-1}$).

É de realçar que os padrões foram preparados em água desmineralizada em detrimento de metanol, uma vez que, segundo *Correia* (2016), *Ribeiro* (2017) e *Dias* (2017), a afinidade do composto com as barras SBSE é superior quando solubilizado em água desmineralizada.

6.2.4. Jar-test: ensaios com adição de PAA

O Jar-Test é um método utilizado em ensaios laboratoriais que permite determinar quais as condições ótimas de doseamento de determinado reagente no tratamento de uma água, nomeadamente doses de reagente e respetivo tempo de contacto.

O equipamento utilizado inclui vários jarros, de igual capacidade, onde é colocada a amostra, sendo possível variar as condições de adição de reagente aplicadas a cada jarro e concluir acerca das condições ótimas de tratamento (Alves, 2010).

Considerando, a base teórica e o objetivo do presente estudo foram realizados três ensaios, onde se aplicaram diferentes dosagens de Ácido Peracético, com diferentes tempos de contacto.

Foram ainda consideradas diferentes matrizes, ou seja, em cada ensaio foram realizadas várias etapas, a primeira com água desmineralizada com o objetivo de servir de controlo e a segunda com água residual tratada.

No primeiro ensaio, consideraram-se as seguintes condições:

- Tempo de contacto: 10 minutos;
- Velocidade de agitação: 200 rpm;
- Concentração de EE2 na amostra: 50 ppb;
- Dosagem de PAA: 1,5,10 e 15 mg.L^{-1} .

No segundo e terceiro ensaios, mantiveram-se as condições apresentadas anteriormente excetuando o tempo de contacto que se aumentou para 15 minutos e 20 minutos, respetivamente, como se mostra na Tabela 22.

Tabela 22 - Condições de tratamento para cada ensaio.

Ensaio	Tempo de Contacto (min)	Matriz	Concentração EE2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Dosagens de PAA (mg.L^{-1})	Velocidade de Agitação (rpm)
1	10	ART ¹	50	1, 5, 10 e 15	200
		AD ²			
2	15	ART ¹	50	1, 5, 10 e 15	200
		AD ²			
3	20	ART ¹	50	1, 5, 10 e 15	200
		AD ²			

¹ Água Residual Tratada; ² Água Desmineralizada.

Após cada ensaio, para quantificar a possível remoção de EE2 das matrizes testadas foi necessário proceder aos métodos de extração e deteção (ponto 6.2.6), concentrando 1L de amostra como esquematizado na Figura 14 do ponto 6.2.3. Nos ensaios em Jar-test procedeu-se previamente a uma etapa de filtração com filtros de 1,2 e 0,4 μm , não sendo necessário proceder à filtração apresentada no ponto 6.2.6.

6.2.5. Solução diluída de PAA

A utilização do PAA para remoção de EE2, requereu o cálculo de um volume a adicionar considerando a dosagem em estudo.

Previamente ao cálculo do volume de PAA a dosear, foi necessário calcular a concentração do reagente utilizado. Assim, através da massa molar (g.mol^{-1}) e da molaridade (mol.L^{-1}) do PAA e considerando o Ácido Peracético a 39 % e com densidade de 1,14 kg.m^{-3} determinou-se a concentração (g.L^{-1}) do ácido peracético.

- Massa Molar

A massa molar consiste na massa (em gramas ou quilogramas) de uma mole de unidades (tais como átomos ou moléculas) de uma substância. Conhecendo a massa atómica de um elemento, sabe-se a

sua massa molar, uma vez que apresentam o mesmo valor. No caso de uma molécula, a massa molar consiste no somatório das massas atômicas de cada elemento da molécula (Chang, n.d.).

- Molaridade

A molaridade, ou concentração molar é definida como o número de moles de soluto em 1 litro de solução. A molaridade traduz-se através da seguinte equação (Chang, n.d.):

$$M = \frac{n^{\circ} \text{ de moles de soluto (mol)}}{\text{volume de solução (dm}^3\text{)}} \quad (9)$$

Sabendo a fórmula molecular do PAA ($C_2H_4O_3$) obtém-se a sua massa molar, que é de 76 g.mol^{-1} :

$$\text{Molaridade} = \frac{\frac{39}{76}}{\frac{100}{1,14} \times 10^{-3}} = 5,85 \text{ g.mol}^{-1} \quad (10)$$

O produto da molaridade ($5,85 \text{ g.mol}^{-1}$) com a massa molar ($76,05 \text{ g.mol}^{-1}$) resulta na concentração do reagente, que é de $444.900 \text{ mg.L}^{-1}$.

Assim, o volume associado às dosagens a aplicar no decorrer dos ensaios, de 1, 5, 10 e 15 mg.L^{-1} , foi de 2,2; 11; 22 e 33 μL , respetivamente.

Uma vez que os volumes obtidos representam valores muito baixos, diluíram-se 5 mL do reagente num litro de água desmineralizada, obtendo-se uma solução de PAA com 2.280 mg.L^{-1} (Figura 15).

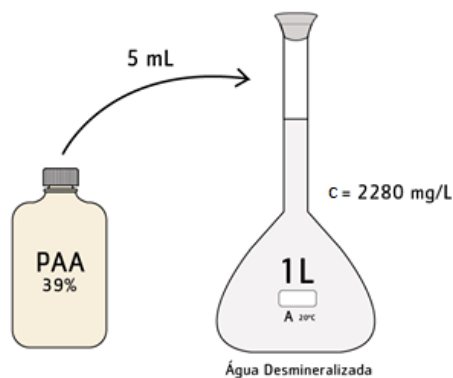


Figura 15 - Esquema representativo da solução diluída de PAA preparada.

Os volumes a dosear foram:

Tabela 23 - Volume de solução de PAA a adicionar nos ensaios.

<i>Dosagem PAA (mg.L⁻¹)</i>	<i>Volume a adicionar</i>
1	440 µL
5	2,20 mL
10	4,40 mL
15	6,60 mL

6.2.6. Procedimento laboratorial adotado

O procedimento laboratorial adotado para o estudo da remoção do composto EE2, baseou-se no método de extração SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) e no método de detecção HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection), desenvolvidos e otimizados por *Fernandes* (2016) e *Vicente* (2016).

Previamente à extração do composto foi necessário filtrar a amostra de água residual utilizada, uma vez que a presença de sólidos suspensos pode ser prejudicial às barras utilizadas no método de extração SBSE. Assim sendo, a amostra de água residual passou por um sistema de filtração com:

- Filtro de 1,2 µm;
- Filtro de 0,4 µm.

Método de Extração SBSE-PDMS

1. Preparação/recolha de 250mL de amostra;
2. Adição de 25 g NaCl às amostras (proporção 100 g.L⁻¹);
3. Mergulho da barra SBSE na amostra salgada;
4. Tapar Erlenmeyer e envolver o preparado com um plástico preto e levar a agitar:
 - a. Extração:
 - i. Velocidade de rotação: 900 rpm;
 - ii. Duração da agitação: 3 h;
5. Extração da barra SBSE para um vial com 3 mL de CH₃CN;
 - a. Dessorção:
 - i. Velocidade de rotação: 300 rpm;
 - ii. Duração da agitação: 30 min;
 - b. Aquecimento em banho de água:
 - i. Duração: 10 min;
 - ii. Temperatura do banho: 60 °C;

- c. Sonicação da amostra (ultrassons)
 - i. Colocar vial num copo com um pouco de água (facilita processo de sonicação);
 - ii. Duração: 5 min;
 - iii. Frequência: 35 kHz;
6. Remoção da barra SBSE da solução sonicada;
 - a. Lavagem e condicionamento da barra SBSE:
 - i. Colocar barra num copo com 3 mL de DMSO;
 1. Velocidade de rotação: 100 rpm;
 2. Duração da lavagem: 1 h;
 - ii. Transferir barra para um vial com 3 mL de CH₃CN:
 1. Velocidade de rotação: 100 rpm;
 2. Duração da lavagem: 12 h;
 - iii. Lavagem por Ultrassons
 1. Duração: 5 min;
7. Filtração da amostra com acrodiscs de 0,2 µm
8. Concentração até à secura da solução sonicada sob fluxo de azoto;
9. Retoma com 0,1 mL de CH₃OH e agitação do conteúdo no vórtex;
10. Colocação da amostra resultante dentro de um vial com um insert de 200 µL;
11. Injeção em HPLC-DAD.



Figura 16 - Esquema representativo do procedimento de extração com SBSE descrito no ponto 6.2.5.
Fonte: (Fernandes, 2016; Vicente, 2016).

Método de Detecção HPLC-DAD

O programa de HPLC utilizado consistiu em:

1. Eluição Isocrática:
 - a. 50% de água ultrapura filtrada (filtro de 0,22 µm) com 0,1% de ácido fórmico (HCOOH);
 - b. 50% de acetonitrilo filtrado (CH₃CN);
2. Tempo de corrida: 10 minutos;

3. Fluxo: 0,5 mL.min⁻¹;
4. Volume de injeção: 20 µL;
5. Temperatura: 20 °C;
6. Comprimento de onda: 215 a 320 nm
7. Coluna: Coluna *Luna* 5 µm C18 (2)
8. Pré-coluna: C18
9. Lavagem entre corridas:
 - a. Metanol (CH₃OH) e água ultrapura filtrada, numa razão de 1:1;
10. Programa de lavagem:
 - a. 100% acetonitrilo filtrado (CH₃CN);
 - b. Fluxo: 0,5 mL.min⁻¹; (ao longo das análises cromatográficas ajustou-se o fluxo para 0,55 de modo a visualizar melhor os picos do composto em estudo)
 - c. Duração: 5 minutos.

6.2.7. Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O LOD é definido como a quantidade mínima de um analito presente na amostra que pode ser detetada de forma confiável e com uma certeza razoável, mas não necessariamente quantificada como um valor exato sobre as condições experimentais estabelecidas (Nollet e Lambropoulou, 2017).

Em termos qualitativos, este limite corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, isto é, de uma amostra que contenha a mesma matriz, mas que não contém o analito (Huber, 2010; Shrivastava e Gupta, 2011; Nollet e Lambropoulou, 2017).

Em cromatografia, o LOD representa a quantidade injetada que resulta num pico, no tempo de retenção do analito em estudo, com uma área pelo menos 2 ou 3 vezes superior à linha de base de ruído (Huber, 2010).

O LOQ de um procedimento analítico consiste na determinação da menor concentração através da qual é possível a quantificação do analito com desempenho aceitável, ou seja, considerando critérios de precisão, veracidade ou incerteza de medição (Huber, 2010; Shrivastava e Gupta, 2011; Nollet e Lambropoulou, 2017).

O LOQ é utilizado para a determinação de produtos de degradação ou impurezas, uma vez que é um parâmetro de ensaios quantitativos para baixos níveis de compostos em matrizes de amostras (Huber, 2010).

Estes limites apresentam um elevado grau de importância em análises de rastreamento, nomeadamente quando é necessário decidir se determinado contaminante se encontra abaixo ou acima de um limite de especificação (Nollet e Lambropoulou, 2017).

A determinação do limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) do HPLC-DAD, teve como base o método de determinação através de brancos, descrito por *Shrivastava e Gupta* (2011).

Como tal, para o cálculo do LOD e LOQ, utilizaram-se as seguintes expressões:

$$LOD = X_{b1} + 3S_{b1} \quad (11)$$

$$LOQ = X_{b1} + 10S_{b1} \quad (12)$$

Onde:

- X_{b1} é a média das concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$) do branco no tempo de retenção do composto;
- S_{b1} é o desvio padrão das concentrações do branco

O LOD e LOQ foram determinados recorrendo aos brancos e em triplicado; após análise dos cromatogramas, retirou-se a área correspondente ao tempo de retenção do composto e calculou-se a área através da curva de calibração.

6.2.8. Método de quantificação do composto EE2

A concentração de EE2 presente em cada amostra, foi determinada através do procedimento desenvolvido por *Fernandes* (2016) e *Vicente* (2016):

1. Análise do cromatograma obtido no HPLC, no comprimento de onda 281 nm;
2. Identificação do pico do composto através do respetivo tempo de retenção e espectro;
3. Quantificação da área do respetivo pico;
4. Determinação da concentração do composto através da equação (13) conseguida pela curva de calibração obtida através do procedimento presente no ponto 6.2.3.

$$y = 11,225x + 654,28 \quad (13)$$

6.2.9. Contribuição do PAA para a Carência Química do Oxigênio

A decomposição do ácido peracético tem como produtos resultantes o peróxido de hidrogénio e o ácido acético, sendo que este último promove o aumento do conteúdo orgânico de uma água residual tratada. Segundo *Kitis* (2004), considerando a estequiometria de formação/decomposição do PAA, por cada 5 mg.L^{-1} doseados deste reagente, poderão formar-se 13 mg.L^{-1} de ácido acético resultando num aumento de 14 mg.L^{-1} de CQO.

Assim sendo, e sabendo que segundo o *Decreto-Lei nº 152/1997* uma água residual urbana tratada deve apresentar uma concentração de CQO, igual ou inferior a 125 $\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$, foi calculada a quantidade de CQO (valor teórico) possivelmente introduzida pela adição de PAA tendo em conta as diferentes dosagens em estudo (Tabela 24).

Tabela 24 - Contribuição teórica do PAA para a CQO.

Dosagem PAA (mg.L⁻¹)	Quantidade Ácido Acético formado (mg.L⁻¹)	CQO introduzida (mg.L⁻¹)
1	2,6	2,8
5	13	14
10	26	28
15	39	42

Como complemento e de modo a verificar a informação obtida através da literatura, durante a realização dos ensaios foi realizada a determinação da CQO antes e após a adição de PAA. Esta determinação foi elaborada através do modo operativo apresentada no Anexo VI, numa solução de CQO conhecida (Hidrogenoftalato de potássio, CQO $\approx 500 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$) que serviu como padrão e numa amostra de água residual submetidas à adição de PAA, com uma concentração de 15 mg.L^{-1} e um tempo de contacto de 20 minutos.

6.2.10. Interferência do PAA com o pH

A adição de uma substância ácida ao efluente leva a uma diminuição do pH. Assim, foi importante estudar as alterações causadas no efluente após a desinfecção com PAA, de modo a perceber como este reagente poderia, eventualmente, afetar os organismos aquáticos e as reações de depuração automática (Cavallini *et al.*, 2013).

Como tal, foi medido o pH da água residual antes e após a adição de PAA (15 mg.L^{-1} ; 20 min.) com um potenciómetro até à estabilização do pH.

6.2.11. Ensaios Ecotoxicológicos: ensaios *in vivo*

Os ensaios biológicos *in vivo*, permitiram avaliar a toxicidade do EE2, do PAA e aferir se este oxidante reduzia a atividade estrogénica deste composto. Foram utilizados exemplares de *Danio rerio* como modelos biológicos e foram analisados os biomarcadores de stress oxidativo - glutathione-s-transferase (GST), catalase (CAT) e peroxidação lipídica (LPO) e o biomarcador de desregulação endócrina, vitelogenina (VTG).

Os Ensaios Ecotoxicológicos consistiram em ensaios de exposição de *D. rerio* ao EE2, ao PAA e a uma solução com EE2 posteriormente tratada com PAA.

Inicialmente, os exemplares de *D. rerio* (Aquaplante, Portugal) foram aclimatizados em condições de laboratório durante duas semanas antes dos ensaios, como tal foram alojados em aquários de vidro

com uma capacidade de 100 L; um sistema de circuito fechado com água da torneira desclorada filtrada, a pH $7,2 \pm 0,1$, temperatura de 20 ± 1 °C, um fotoperíodo de 12:12 (luz:escuro) e arejamento contínuo ($> 6 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$).

Posteriormente, os peixes adultos ($n= 38$; $0,3 \pm 0,1 \text{ g}$; $2,4 \pm 0,2 \text{ cm}$), de ambos os sexos, foram distribuídos por 5 tanques de forma aleatória, sendo alimentados diariamente com flocos comerciais de alimentos secos (marca *Tetra*) no decorrer do ensaio.

Estes ensaios decorreram durante 7 dias, em tanques com um volume de 10 L, com água desmineralizada e onde ocorreu mudança do meio a cada 48 h, com contaminação do mesmo (50 ppb de EE2), como esquematizado na Figura 17.

Ensaio de exposição

(n = exemplares de *D. rerio* em cada tanque)

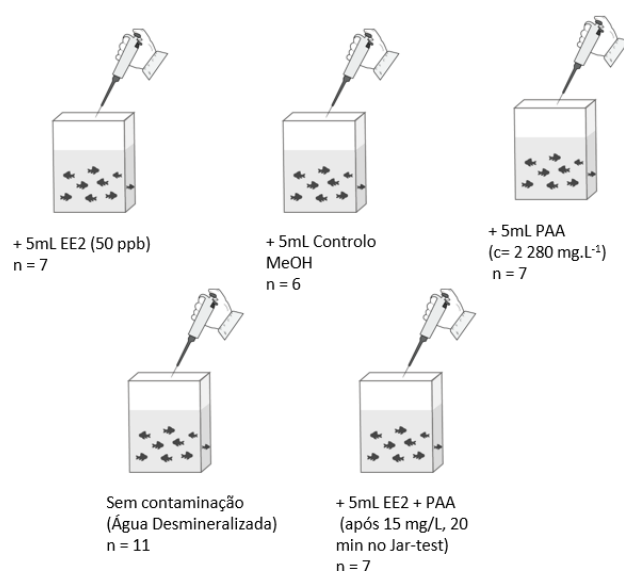


Figura 17 - Ensaio de exposição do *D. rerio* ao EE2 e ao PAA.

Após cada ensaio, os exemplares de *D. Rerio* foram recolhidos, eutanasiados por asfixia e conservados a 4°C, sendo posteriormente realizada a preparação da amostra, que consistiu na homogeneização de tecidos e centrifugação da amostra. Assim, cada exemplar foi homogeneizado individualmente através de trituração (*Homogeneizador Tissue Master 125*), em 3 mL de solução tampão PBS (Na_2HPO_4 com KH_2PO_4 , KCl e NaCl, todos *Sigma-Aldrich*, em 1L de água MilliQ, pH = 7,4), e divididos igualmente em 2 eppendorfs. De seguida, efetuou-se a separação da amostra através da centrifugação, a 1000 g durante 15 minutos, a 4°C.

A etapa seguinte consistiu na realização dos procedimentos que permitiram efetuar as análises referentes aos indicadores referidos anteriormente e respetivas leituras em espectrofotómetro (*Biorad Benchmark, EUA*), como representado na Figura 18.

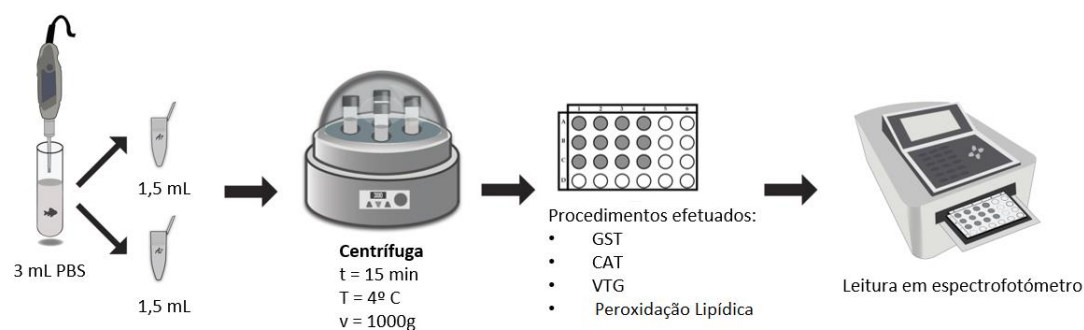


Figura 18 - Procedimento experimental adoptado nos bioensaio.

Os procedimentos adotados para análise dos biomarcadores foram:

- Glutathione-s-transferase (GST)

A atividade total da GST foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Habig *et al.* (1974) através da formação da glutathione conjugada (GSH) e do CDNB. Assim, foi necessário preparar a mistura reacional (Mix), que para um volume final de 10 mL, consistiu na junção de:

- 9,8 mL tampão PBS;
- 0,1 mL L-glutathione Reduzida (GSH) (*Sigma-Aldrich*);
- 0,1 mL Substrato CDNB (*Sigma-Aldrich*).

Em cada poço da placa adicionaram-se 20 µL da amostra, seguido da adição de 180 µL de solução Mix de substrato aos poços com o auxílio de uma pipeta multicanal. Reservando poços para o controlo de GST (20 µL GST padrão + 180 µL solução Mix de substrato) e para o branco (200 µL solução Mix de substrato).

Imediatamente após a mistura, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 340 nm, minuto a minuto, durante 6 minutos. A variação da absorvância por minuto foi estimada (ΔA_{340}) e a taxa de reação a 340 nm foi determinada utilizando o coeficiente de extinção de CDNB de $0,0053 \mu M^{-1}cm^{-1}$. Os resultados foram expressos em relação à concentração total de proteína da amostra (nmol/min/mg proteína total), através da seguinte equação:

$$Act. GST (nmol/min/mg) = \frac{\Delta A_{340}}{\epsilon m M} \times \frac{V_{total}}{V_{amostra}} \quad (14)$$

Nota: No preenchimento dos poços, é necessário ter em conta que a cada amostra foram designados 3 poços, ou seja, 3 réplicas de uma mesma amostra.

- Catalase (CAT)

O método utilizado para a análise deste biomarcador utiliza a função peroxidativa da catalase para a determinação da actividade enzimática e baseia-se na reação desta enzima antioxidante com o metanol na presença de uma concentração óptima de peróxido de hidrogénio, H_2O_2 . O formaldeído

produzido foi medido com o Purpald (cromogénico), que após a oxidação mudou de incolor para a cor roxa (Johansson & Borg, 1988; Wheeler *et al.*, 1990).

O procedimento utilizado para a determinação deste indicador baseou-se no trabalho desenvolvido por Johansson & Borg (1988).

Assim, para a determinação da CAT foram necessárias proceder à preparação em fresco de algumas soluções inerentes ao método, nomeadamente:

- Formaldeído a 4,25 mM - tirar 3,2 µL de formaldeído a 37% para 10 mL de água Milli-Q (*Sigma-Aldrich*);
- Peróxido de hidrogénio com concentração final de 0,035 M - tirar 3,6 µL de H₂O₂ a 30-37% para 10 mL de água Mili-Q (*Sigma-Aldrich*);
- Soluções Padrão - A preparação destas soluções deve ser realizada em 7 eppendorfs, denominados de A-G, de acordo com o esquematizado na Tabela 25.

Tabela 25 - Preparação dos Padrões de Formaldeído.

Eppendorf	Formaldeído (µL)	Sample Buffer (µL) ¹	Concentração Final (µM Formaldeído) ²
A	0	1,000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

¹ 25 mM de Fosfato de potássio, pH = 7,0 (*Sigma-Aldrich*); contendo 1 mM de EDTA (*Riedel-Haën*) e 0,1% de BSA), conservado a 4°C; ²Concentração Final de formaldeído em 170 µL;

O ensaio começou com o enchimento dos poços necessários para leitura das amostras. Adicionou-se 100 µL de Assay Buffer (Fosfato de potássio 100 mM, pH = 7,0, *Sigma-Aldrich*), diluído, e 30 µL de metanol (*Sigma-Aldrich*) ao total dos poços contabilizados, tendo em conta o número de padrões, controlos e amostras utilizados no ensaio, e considerando que se deverão apresentar em triplicado.

De seguida e considerando o passo descrito anteriormente, adicionaram-se aos poços:

- destinados às soluções padrão de formaldeído: 20 µL das soluções padrão preparadas nos eppendorfs assinalados de A-G;
- destinados ao controlo positivo (CAT de fígado bovino): 20 µL de CAT diluída (preparar a 1 mg/mL e diluir entre 1:500 e 1:1000 para utilizar como controlo positivo (dentro dos limites da curva de calibração));
- destinados às amostras: 20 µL de cada amostra.

O início da reação dá-se com a adição de 20 µL de Peróxido de Hidrogénio (diluído) em todos os poços utilizados, cobrindo-se de seguida a placa com papel de alumínio e incubando no *shaker* (ELMI DOS-20S) durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, adicionaram-se 30 µL de Hidróxido de Potássio (KOH a 10 M, *Sigma-Aldrich*) a cada poço para terminar a reação e depois adicionaram-se 30 µL de Purpaldol (34,2 mM – dissolver em 1 mL H₂O + NaOH (pellet) e depois preencher com HCl (0,5 M), *Sigma-Aldrich*) a cada poço, cobrindo-se novamente com o papel de alumínio e incubando no *shaker* por 10 minutos à temperatura ambiente.

Após isto, foram adicionados 10 µL de Periodato de Potássio (65,2 mM em 0,5 M KOH, *Sigma-Aldrich*) a todos os poços; a placa é coberta e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente no *shaker*.

Por último, procede-se à leitura das absorvâncias a 540 nm utilizando um espectrofotómetro de leitura de placas.

Para o cálculo da concentração do formaldeído nas amostras utilizou-se a equação obtida a partir da regressão linear da curva resultante dos padrões; substituindo os valores das absorvâncias correspondentes a cada amostra na seguinte equação:

$$\text{Formaldeído } (\mu\text{M}) = \left[\frac{\text{Absorvância da amostra} - \text{intercepção com y}}{\text{declive}} \right] \times \frac{0,24 \text{ mL}}{0,02 \text{ mL}} \quad (15)$$

A actividade da CAT de cada amostra foi expressa em nmol/min/ML e foi calculada através da equação:

$$\text{Actividade CAT} = \frac{\mu\text{M da amostra}}{20 \text{ min}} \times \text{Diluição amostra} \quad (16)$$

- Vitelogenina (VTG)

A determinação deste bioindicador foi realizada considerando o “*Protocolo Elisa Indireto*”, e o procedimento adotado para a determinação da VTG incluiu os seguintes passos:

1. Preparação da VTG padrão: diluir a solução mãe em TBSTB (10 mM Tris-HCl, pH = 7,0 + 150 mM NaCl 0,05% de Tween, *Sigma-Aldrich*) para concentrações de 10 a 1000 ng/mL (ou outra diluição após a optimização).
2. Preparação das amostras de plasma sanguíneo: diluir as amostras pelo menos de 1:200 em PBS (0,01M NaPO₄ + 0,15 M NaCl, pH = 7,4) para evitar interferências. No caso dos machos

esta diluição é o ponto de partida. Para as fêmeas a primeira diluição deve ser de 1:1000 em PBS.

3. Adicionar 50 µL de amostra de plasma diluído aos poços da placa de ELISA, considerando que cada amostra se apresenta em triplicado na placa.
4. Incubar a placa de ELISA *overnight* a 4°C.
5. Lavar a placa 4X com TBST para remover o excesso de reagente.
6. Adicionar 360 µL de solução bloqueadora (10 % BSA, *Nzytech*, em TBST com azida sódica a 0,02%, *Fluka*) e incubar a placa durante 2 horas à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C.
7. Lavar a placa 4X com TBST.
8. Adicionar 50 µL de anticorpo 1º diluído (*Biosense*, Noruega) para a concentração apropriada (0,1 – 5 µg/L) em solução de tampão bloqueador (30 mM carbonato de dietanolamina a pH = 9,6 + 2 mM MgCl₂).
9. Incubar *overnight* a 4°C.
10. Remover o anticorpo não ligado e lavar a placa 4X com TBST.
11. Adicionar o anticorpo 2º diluído (*Biosense*, Noruega) na concentração apropriada em solução tampão bloqueador e incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.
12. Lavar a placa 4X com TBST.
13. Adicionar o substrato (10 mg de PnPP + 157 mg Tris HCL + 58,4 mg NaCl + 50 µL Cl₂Mg, pH = 8,8; *Sigma-Aldrich*): 100 µL a cada poço da placa.
14. Incubar durante 10-30 min à temperatura ambiente.
15. Adicionar 50 µL de solução STOP (3N NaOH, *Sigma-Aldrich*).

- Peroxidação Lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi determinada considerando o método TBARS, que se baseia na detecção espectrofotométrica do MDA, que é um produto resultante da peroxidação lipídica, após reação com o TBA numa solução ácida e a elevada temperatura.

O protocolo adotado para determinação deste bioindicador de stress oxidativo baseou-se no trabalho desenvolvido por *Ohkawa et al.* (1979).

Assim, para o desenvolvimento de ensaio foi necessário realizar a seguinte preparação de reagentes:

- Solução Mãe: MDA (*Merck Millipore*, Portugal) a 1 µM (1,642 µL para um volume final de 10 mL de água Milli-Q);
- Tampão Fosfato: PBS com pH = 7-7,4;
- TBA (conservar no escuro): 250 mg de TBA para 25 mL de água Milli-Q (preparar no agitador, sem aquecimento e dissolver com uma pastilha de NaOH);
- TCA: 5g de TCA (Ácido Tricloroacético a 20%, *Panreac*) para 25 mL de água Milli-Q;
- SDS: 8,1 g de SDS (*Sigma-Aldrich*) para 100 mL de água Milli-Q;

O ensaio iniciou-se com a preparação das soluções Padrão em tubos eppendorf individuais, a partir da solução mãe de MDA, e seguindo o procedimento descrito na Tabela 26.

Tabela 26 - Padrões de MDA: concentrações e respetivos volumes de solução mãe.

[μ M]	0	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,010	0,020	0,050	0,100	0,200	0,300
Água (μ L)	1000	999	998	997	996	995	990	980	950	900	800	700
Solução mãe de MDA a [1μ M] (μ L)	-	1	2	3	4	5	10	20	50	100	200	300

Para a preparação da recta de calibração, retiraram-se para novos eppendorfs 5 μ L de cada solução e adicionaram-se os restantes reagentes. Seguiu-se posteriormente o procedimento da Figura 19. O mesmo procedimento deve ser adotado para as amostras.

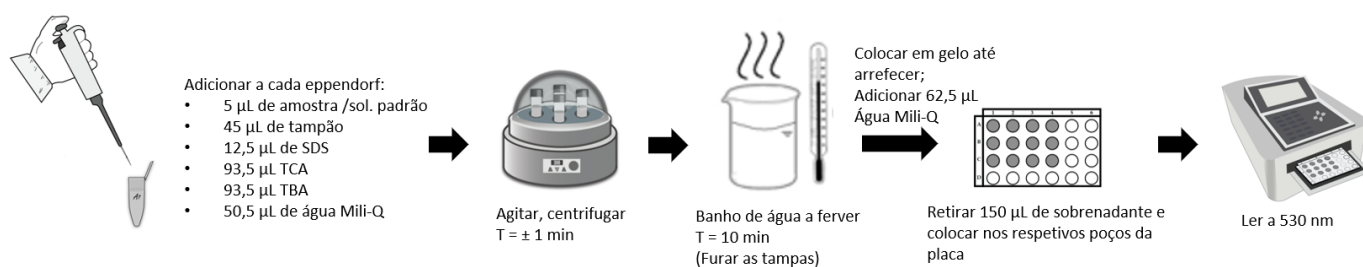


Figura 19 - Procedimento experimental da Peroxidação lipídica.

O cálculo dos biomarcadores analisados deve considerar a concentração de proteína presente em cada amostra. Assim para a quantificação de proteínas realizou-se a metodologia desenvolvida por *Bradford* (1976) apresentada no Anexo VII.

A análise estatística dos resultados obtidos para os diferentes bioindicadores foi realizada através do Teste t-student que permitiu detetar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dados.

7. Resultados e Discussão

7.1. Brancos analisados

Branco c/ Água Desmineralizada e EE2

O branco com água desmineralizada e uma concentração de 100 ppb de EE2 foi realizado com o propósito de observar o pico referente ao composto e o tempo de retenção correspondente. Assim, através da análise do cromatograma da Figura 20 foi possível ver a expressão que o composto tem e o seu tempo de retenção, 5,34 min.

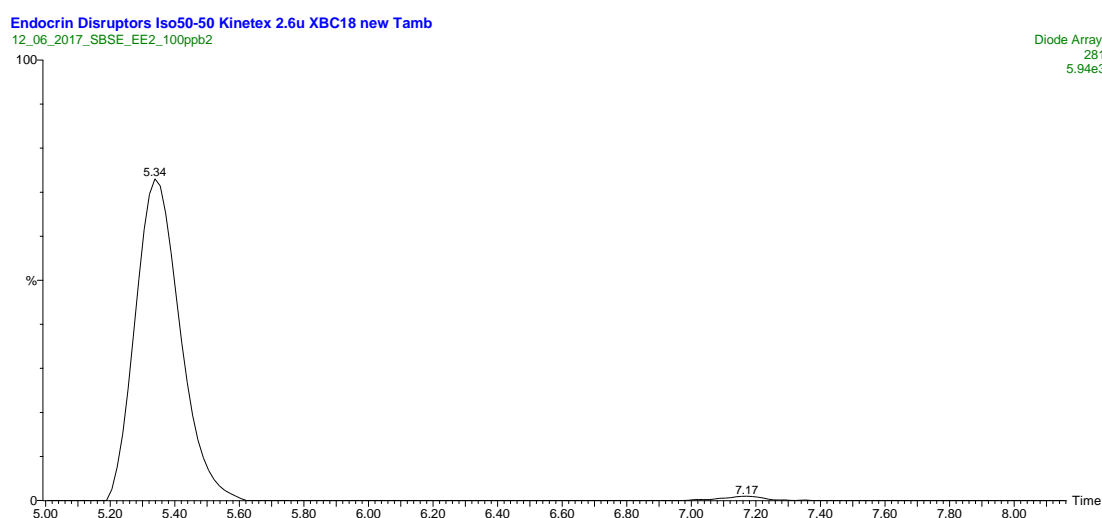


Figura 20 - Cromatograma referente à amostra com água desmineralizada e com 100 ppb de EE2 ($\lambda=281$ nm).

Branco c/ Água Desmineralizada e PAA

O ensaio correspondente à injeção de uma amostra de água desmineralizada com ácido peracético, permitiu entender o seu comportamento e a possibilidade de aparecerem picos relacionados com produtos de degradação deste oxidante que possam interferir com o EE2. Desta forma, foram utilizadas as condições mais desfavoráveis, consideradas nos ensaios de remoção (maior concentração e maior tempo de contacto). Através da análise do cromatograma da Figura 21, foi possível verificar que não existiram compostos que afetaram a leitura do EE2, isto é, que tivessem um tempo de retenção na coluna de cerca de 5,30 minutos. No entanto ao minuto 7,14 apareceu um pico que se pensa que poderá ser algum subproduto da decomposição do PAA.

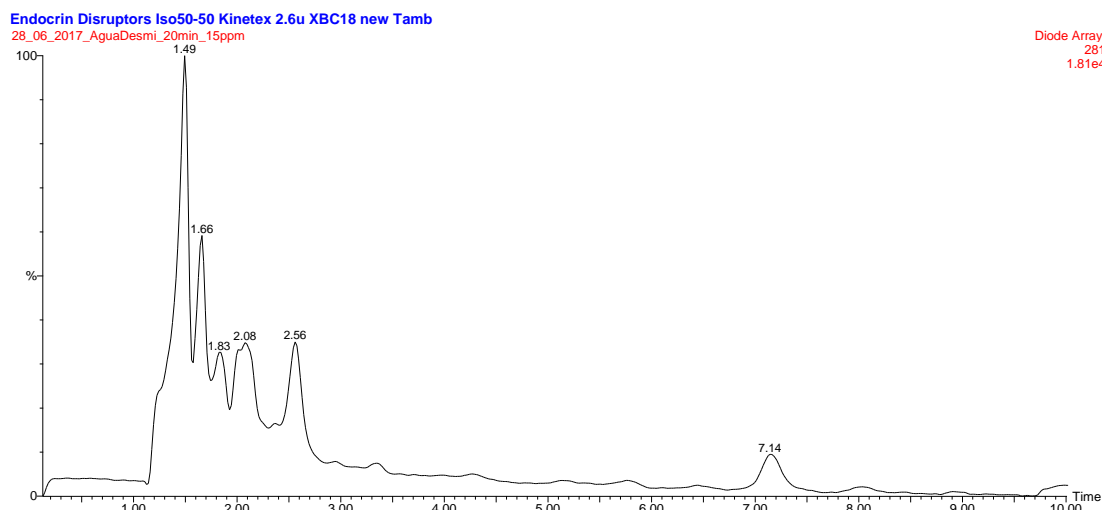


Figura 21 - Cromatograma referente à amostra de água desmineralizada com PAA, com uma dose aplicada de 15 mg.L^{-1} e 20 minutos de contacto ($\lambda=281 \text{ nm}$).

Branco c/ Água Residual

A amostra injetada de água residual após o processo extrativo com as SBSE teve como objetivo verificar a existência de EE2 ou de algum composto que pudesse interferir com a leitura no seu tempo de retenção. Pela observação do cromatograma da Figura 22, foi possível aferir que a água residual, no comprimento de onda de 281 nm, não apresentou nenhum composto que pudesse interferir com a leitura do EE2.

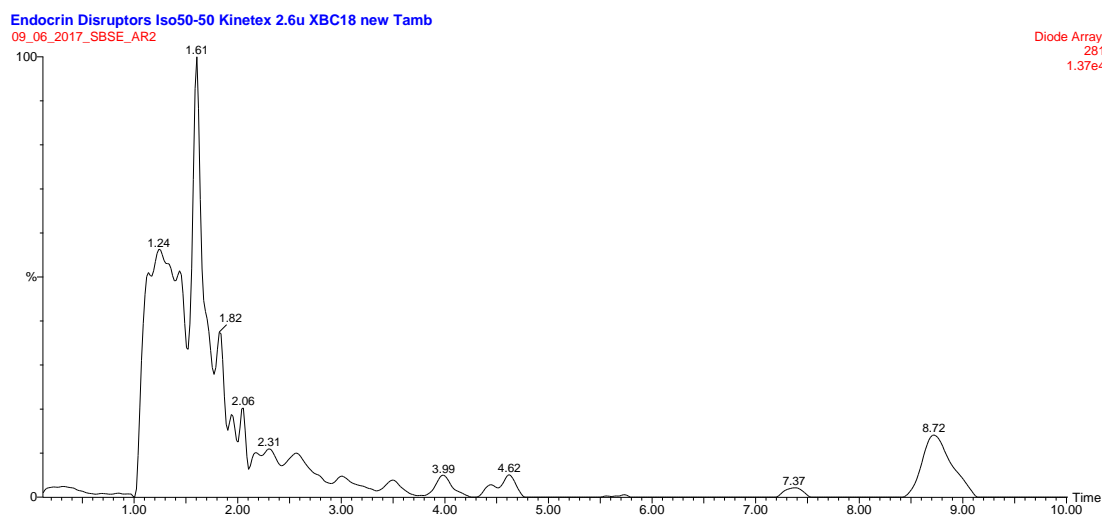


Figura 22 - Cromatograma referente à amostra de água residual ($\lambda=281 \text{ nm}$).

Branco c/ Água Residual e EE2

A partir do cromatograma da Figura 23, foi possível observar o comportamento do EE2 quando adicionado à matriz complexa de água residual. Foi possível verificar que para uma concentração de 50 ppb de EE2, o pico resultante, aos 5,40 minutos, é bem definido e relativamente fácil de identificar.

Foi ainda possível verificar que com a adição deste composto não se verificou a formação de subprodutos resultantes da reação de EE2 com a água residual.

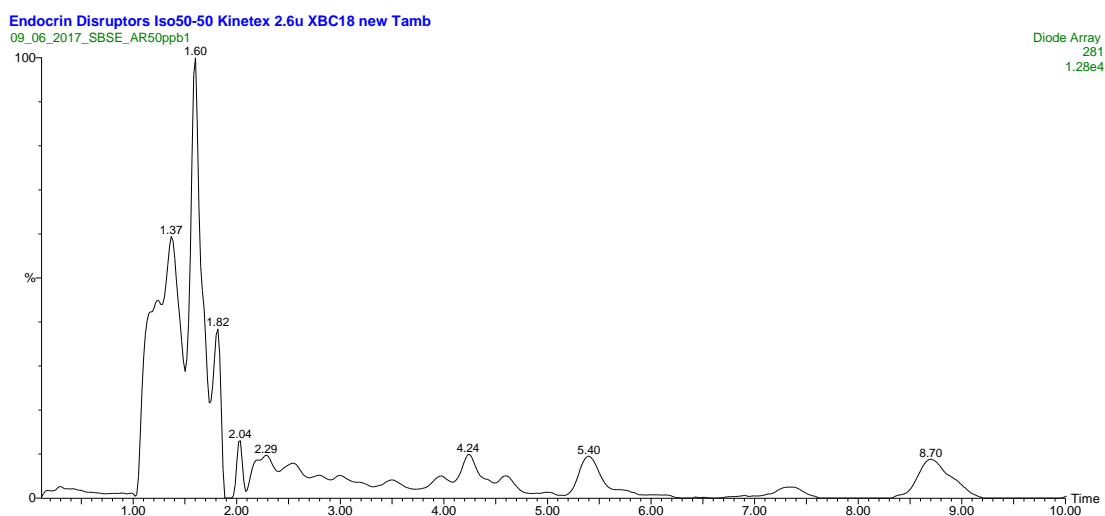


Figura 23 - Cromatograma referente à amostra de água residual e 50 ppb de EE2 ($\lambda=281$ nm).

Branco c/ Água Residual e PAA

A realização deste branco teve como objetivo observar a interação entre a água residual e o oxidante PAA e a possibilidade de surgirem subprodutos que pudessem interferir com a leitura do composto em estudo. Pela observação do cromatograma da Figura 24, foi possível verificar o aparecimento de um pico aos 5,48 minutos, que poderia interferir com a leitura do EE2. No entanto, uma vez que a área correspondente não apresentou uma expressão significativa, este valor não foi considerado ao longo dos ensaios.

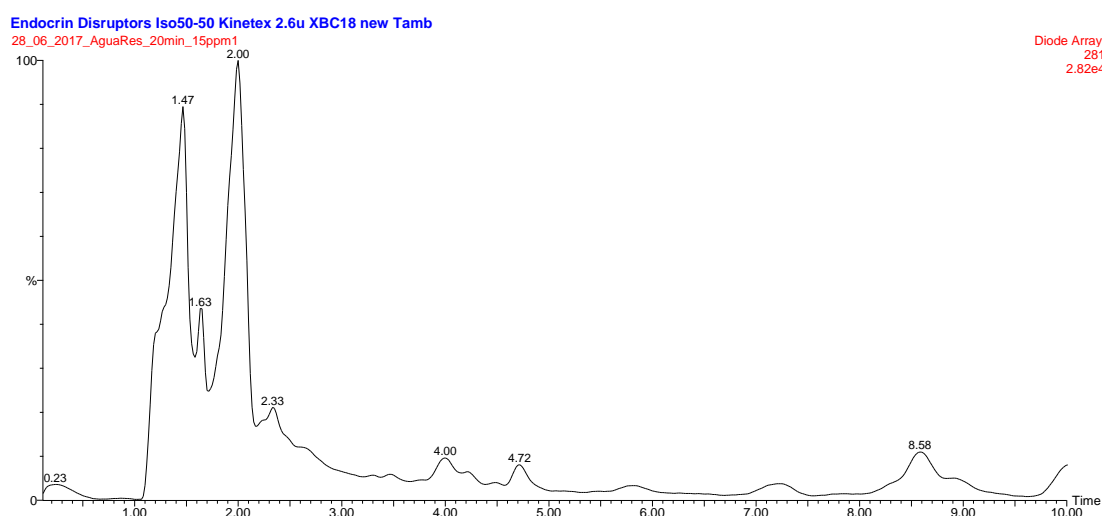


Figura 24 - Cromatograma referente à amostra de água residual e PAA, com uma dose de 15 mg.L^{-1} e 20 minutos de tempo de contacto ($\lambda=281$ nm).

7.2. Curvas de Calibração utilizadas nos ensaios, LOD e LOQ

Na Figura 25 mostra-se a curva de calibração utilizada nos ensaios, de modo a quantificar as concentrações de EE2 presentes nas amostras analisadas ao longo do estudo efetuado.

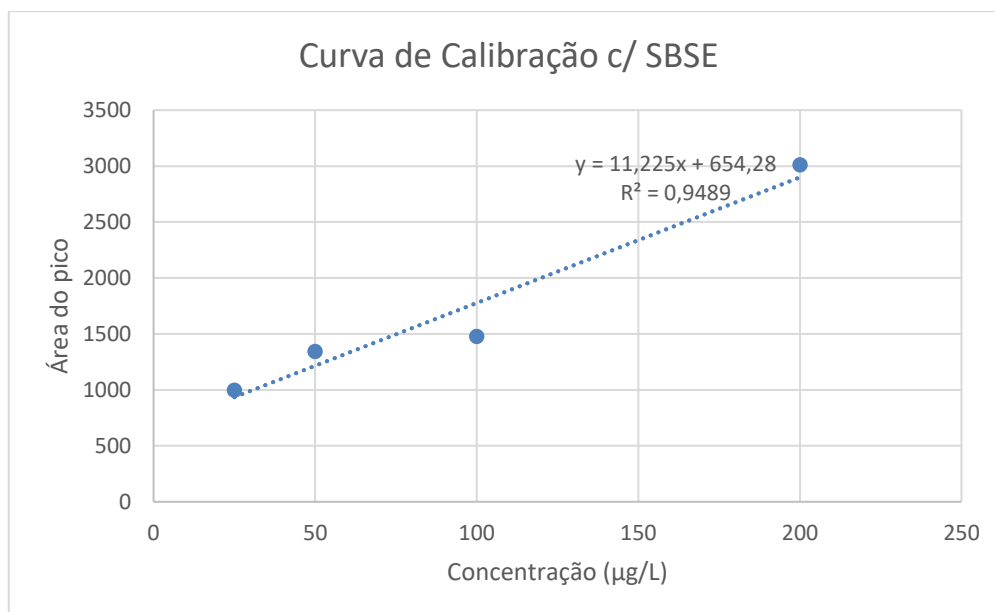


Figura 25 - Curva de calibração de EE2 utilizada ao longo dos ensaios (1 L).

Na determinação das concentrações do EE2, utilizou-se a equação resultante da curva de calibração. O coeficiente de correlação R^2 obtido foi de 0,9489, e a expressão da reta foi $y = 11,225x + 654,28$.

No Anexo VIII, apresenta-se a curva de calibração com 250 mL, e os cromatogramas referentes a cada curva (250 mL e 1 L), demonstrando, como esperado, que ao concentrar 1 L de solução os picos observados referentes ao EE2 apresentam uma área superior à dos picos obtidos com a concentração de 250 mL.

Os valores de LOD e LOQ calculados através das expressões apresentadas no ponto 6.2.7, encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27 - Limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do EE2.

Limite de Deteção ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
1,63	4,14

7.3. Ensaios de remoção com PAA

Ensaio 1

O ensaio 1, consistiu na adição de PAA para um tempo de contacto de 10 minutos com concentrações de 1, 5, 10 e 15 mg.L⁻¹ em água residual tratada.

Na Figura 26 são apresentadas as remoções obtidas para o Ensaio 1, relativamente às diferentes concentrações de PAA consideradas.

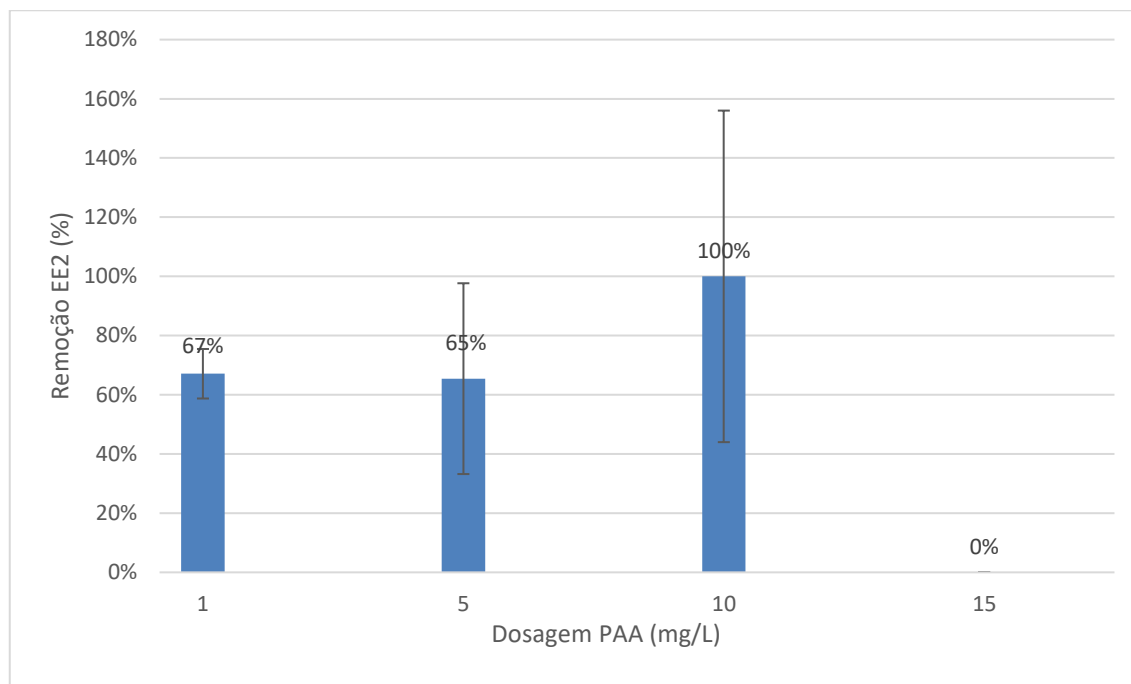


Figura 26 - Eficiências de remoção de EE2 com a adição de PAA no ensaio 1 (TC=10 minutos).

Neste ensaio, observou-se que as maiores remoções de EE2 obtiveram-se para um tempo de contacto de 10 minutos e para uma concentração de 10 mg.L⁻¹, com uma remoção de 100%. No entanto, para as concentrações de 1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹, as remoções obtidas foram de 67% e 65%, respetivamente. Por outro lado, para uma concentração de 15 mg.L⁻¹ de PAA não se verificou remoção do EE2 após 10 minutos de contacto.

Ensaio 2

O ensaio 2 difere do primeiro ensaio, apenas no tempo de contacto utilizado, isto é, o tempo de contacto passou de 10 para 15 minutos.

Na Figura 27 mostram-se as remoções obtidas para o Ensaio 2, relativamente às diferentes concentrações de PAA consideradas.

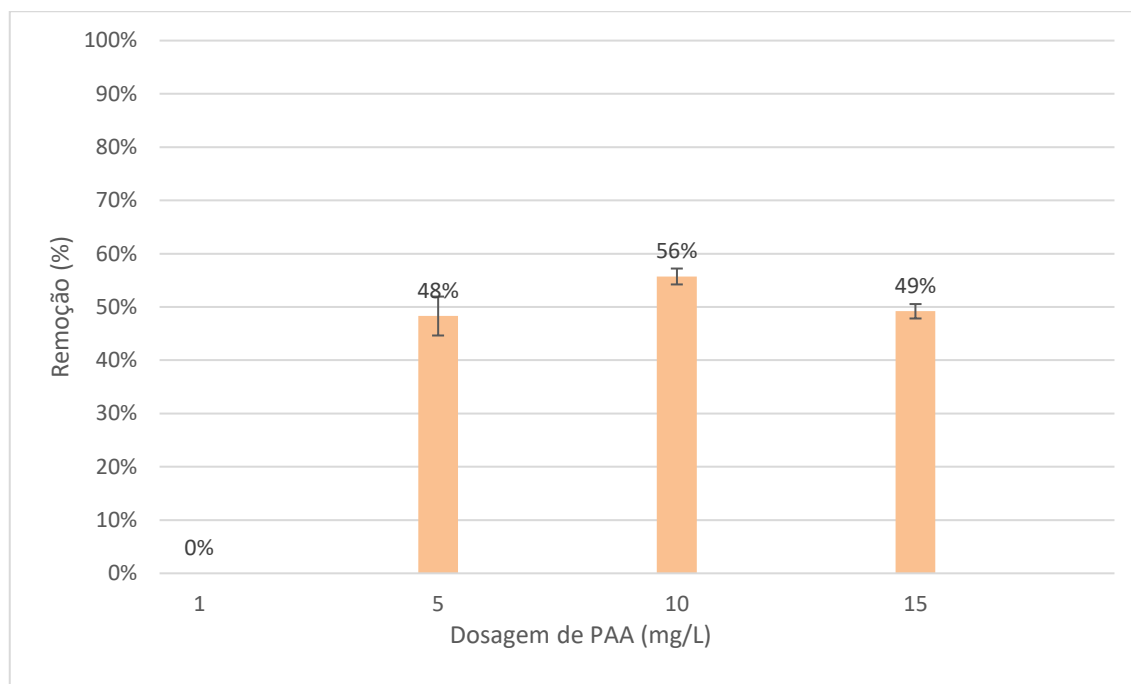


Figura 27 - Eficiências de remoção de EE2 com a adição de PAA no ensaio 2 (TC=15 minutos).

No ensaio 2, observou-se que existiu remoção de EE2 para as concentrações de PAA de 5, 10 e 15 mg.L⁻¹ – 48%, 56% e 49%, respetivamente. Contudo, para uma concentração de PAA de 1 mg.L⁻¹ não se verificou qualquer remoção, após 15 minutos de contacto.

Ensaio 3

Comparativamente aos ensaios 1 e 2, o ensaio 3 diferiu apenas no tempo de contacto adotado, isto é, considerou-se, um tempo de contacto, neste ensaio, de 20 minutos.

Na Figura 28 mostram-se as remoções obtidas para o Ensaio 3, relativamente às diferentes concentrações de PAA testadas.

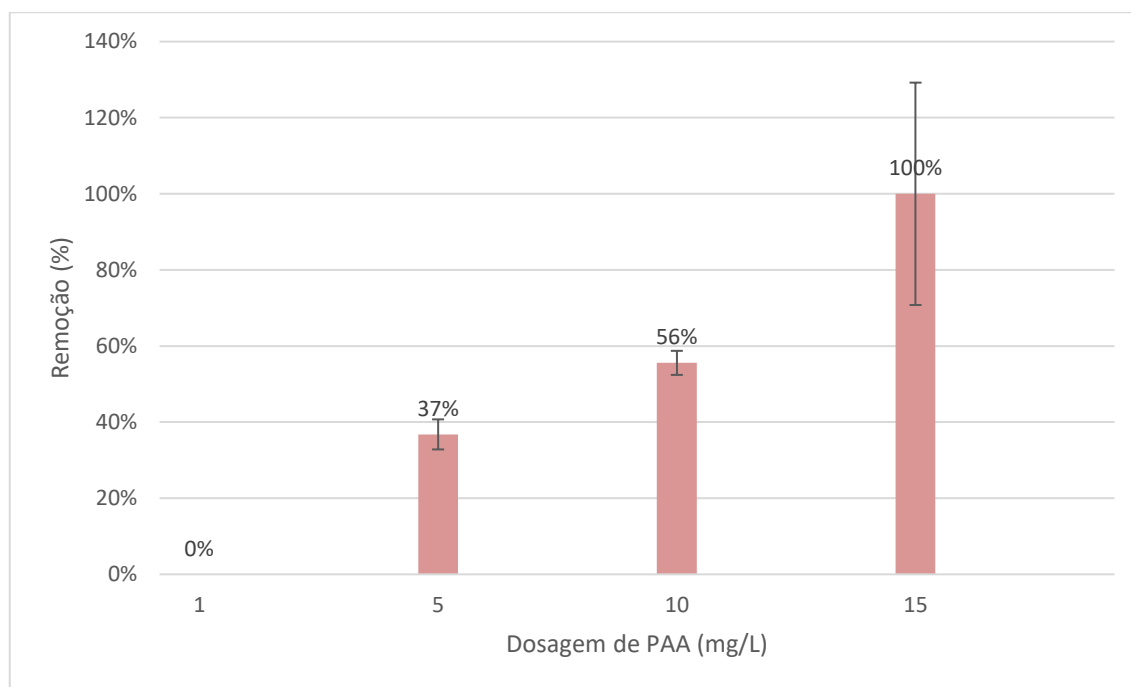


Figura 28 - Eficiências de remoção de EE2 com a adição de PAA no ensaio 3 (TC=20 minutos).

Neste ensaio, para uma concentração de PAA de 1 mg.L⁻¹, não se verificou qualquer remoção de EE2. Contudo, com o aumento da concentração de PAA, verificou-se igualmente um aumento na remoção de EE2, tendo-se obtido remoções de 37%, 56% e 100%, para as concentrações de 5, 10 e 15 mg.L⁻¹, respetivamente.

Resumo

Na Figura 29 mostra-se um resumo dos resultados obtidos para os 3 ensaios, para as diferentes concentrações de PAA (1, 5, 10 e 15 mg.L⁻¹) e diferentes tempos de contacto (10, 15 e 20 minutos).

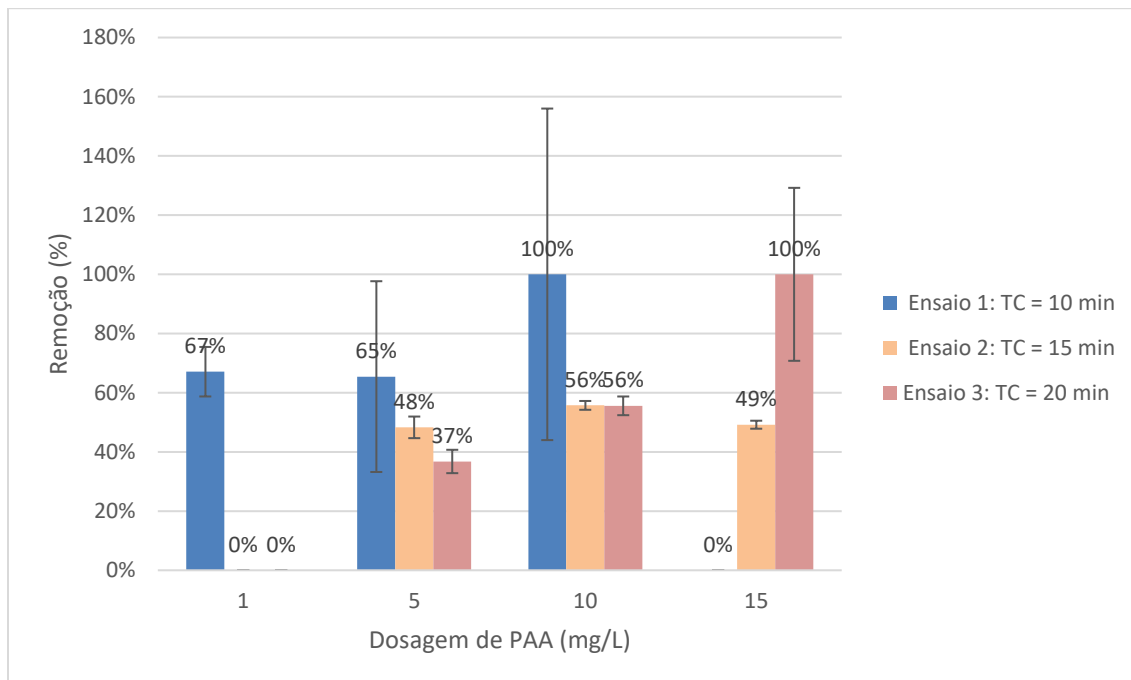


Figura 29 - Eficiências de remoção de EE2 com adição de PAA.

Quando se adicionou 1 mg.L⁻¹, apenas se verificou remoção de EE2 para o tempo de contacto de 10 minutos - 67%. O que poderá indicar que esta dosagem poderá ser insuficiente.

Quando se aumentou a concentração de PAA para 5 mg.L⁻¹, verificou-se que, com o aumento do tempo de contacto, ocorreu uma diminuição da remoção de EE2, nomeadamente – 65%, 48% e 37% para os tempos de contacto de 10, 15 e 20 minutos, respetivamente.

Com uma concentração de PAA de 10 mg.L⁻¹, para um tempo de contacto de 10 minutos, verificou-se uma remoção de 100%, enquanto que para os tempos de contacto de 15 e 20 minutos a remoção obtida foi apenas de 56%.

Quando se aumentou a concentração de PAA adicionada para 15 mg.L⁻¹, a remoção de EE2 foi proporcional ao aumento do tempo de contacto, isto é, para um tempo de contacto de 10 minutos não ocorreu remoção, contudo, para 15 minutos e 20 minutos, as remoções obtidas foram de 49% e 100%, respetivamente.

Com os resultados obtidos, conclui-se que as concentrações de PAA adicionadas de 10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹, para os tempos de contacto de 10 e 15 minutos, respetivamente, são as que apresentaram os melhores resultados, isto é, foi possível atingir 100 % de remoção de EE2.

7.4. Influência do PAA nas propriedades físico-químicas da AR

CQO

Após a determinação da CQO, antes e após a adição de PAA, numa solução padrão e em água residual foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - CQO, antes e após a adição de PAA, de uma solução padrão e água residual.

CQO (mgO ₂ .L ⁻¹)				
	Inicial	c/PAA	Incremento real	Incremento teórico
Solução Padrão	517,65	527,06	9,41	42
Água Residual	41,34	59,71	18,37	

O incremento de CQO introduzido pela adição de PAA na solução padrão foi de 9,41 mgO₂.L⁻¹, enquanto que na água residual a CQO aumentou 18,37 mgO₂.L⁻¹. Considerando a concentração de PAA utilizada - 15 mg.L⁻¹, o aumento de CQO esperado após a adição do oxidante seria de 42 mgO₂.L⁻¹, o que não se verificou.

Na literatura sobre desinfecção e utilização do PAA é possível obterem-se valores de CQO medidos após aplicação do PAA superiores aos valores de CQO teóricos esperados (Tabela 29). Sabe-se também, que as alterações nos valores de CQO dependem da composição química do PAA usado (Luukkonen *et al.*, 2014).

Tabela 29 - Contribuição do PAA para a CQO segundo diferentes autores.

Dosagem PAA (mg.L ⁻¹)	CQO introduzida (mg.L ⁻¹)	CQO teórico (mg.L ⁻¹)	Referência
1	1,94	2,8	(Cavallini <i>et al.</i> , 2013)
1	4		(Luukkonen <i>et al.</i> , 2014)
1 a 3	5 a 6	2,8 a 8,4	(Wagner, Brumelis, & Gehr, 2002)

Esta discrepância, entre os valores reais e teóricos, pode ser explicada através da presença de resíduos de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e do próprio perácido, uma vez que apresentam a capacidade de reagir com o oxidante (ião dicromato) utilizado no método de medição da CQO, resultando num erro positivo nos resultados da CQO (Wagner *et al.*, 2002; Luukkonen *et al.*, 2014; Luukkonen e Pehkonen, 2016).

Numa amostra que não contém compostos orgânicos obtiveram-se valores de CQO devido à presença de peróxido de hidrogénio (Luukkonen *et al.*, 2014). Segundo Lee *et al.* (2011), referenciado por

Lukkonen *et al.* (2014), 1 mg de H₂O₂ consegue causar um aumento de cerca de 0,50 a 0,58 mg de CQO em águas residuais de gado.

Os desinfetantes que apresentem características oxidantes, são passíveis de aumentar o valor da CQO uma vez que promovem reações que tornam compostos orgânicos recalcitrantes mais biodegradáveis (Wagner *et al.*, 2002).

Contrariamente ao que foi descrito, já foi observada a diminuição dos valores de CQO o que pode ser explicado pela oxidação da matéria orgânica (Luukkonen e Pehkonen, 2016).

No entanto, caso se utilizem doses moderadas de PAA, o aumento de carga orgânica das águas residuais tratadas não será substancial (Luukkonen *et al.*, 2014), fenómeno que se verificou nas medições efetuadas.

Como referido no ponto 6.2.9, o limite de descarga de CQO deve ser igual ou inferior a 125 mgO₂.L⁻¹, que no caso da água residual em estudo, se for um intervalo de valores entre o incremento real (18,37 mgO₂.L⁻¹) e o incremento teórico (42 mgO₂.L⁻¹), a água residual estará sempre em conformidade podendo ser descarregada no meio recetor.

pH

Na Tabela 30 mostram-se os valores de pH medidos após a adição de diferentes concentrações de PAA.

Tabela 30 - Valores de pH da água residual após a adição de 1, 5, 10 e 15 mg.L⁻¹.

PAA (mg/L)	-	1	5	10	15
pH AR	7,85	7,85	7,75	7,60	7,47

Da observação dos resultados obtidos verifica-se que com o aumento da concentração de PAA o valor de pH mostrou ser inversamente proporcional a esse crescimento, no entanto esta variação não foi significativa.

Estas observações são corroboradas por Sartori (2004) e Souza (2006), citados por Cavallini *et al.* (2013), que ao testarem doses baixas de PAA, também não observaram mudanças significativas no pH.

A aplicação de PAA em concentrações utilizadas habitualmente para desinfecção, isto é, até 10 mg.L⁻¹, não conduzem a alterações significativas de pH (Cavallini *et al.*, 2013).

7.5. Ensaios ecotoxicológicos

Como referido anteriormente foram realizados ensaios ecotoxicológicos para tentar perceber se (i) a remoção de EE2 era efetiva e não apenas não detetável através do método analítico usado e, (ii) se a adição de PAA a uma água residual (embora tratada) poderia formar, à semelhança do cloro, compostos tóxicos e prejudiciais à saúde dos organismos.

Assim, realizaram-se ensaios de exposição onde estiveram em estudo cinco grupos diferentes, (1) o controlo (H₂O) em que os peixes apenas estiveram em contacto com água – Controlo; um tanque com metanol e água (2) (H₂O+MeOH) para excluir qualquer efeito que o metanol pudesse induzir nesses biomarcadores, e porque o EE2 foi adicionado já solubilizado numa solução de metanol; um tanque com PAA (3) onde os peixes foram expostos apenas ao PAA, para aferir possíveis efeitos deste desinfetante nos biomarcadores estudados; um tanque com EE2 (4), onde os peixes foram expostos, a EE2 e, finalmente um tanque com EE2+PAA (5) para estudar os efeitos deste desinfetante após a reação com o EE2.

GST

Na Figura 30 mostram-se os valores de glutationa-s-transferase após os ensaios de exposição *do D. rerio* ao PAA e EE2.

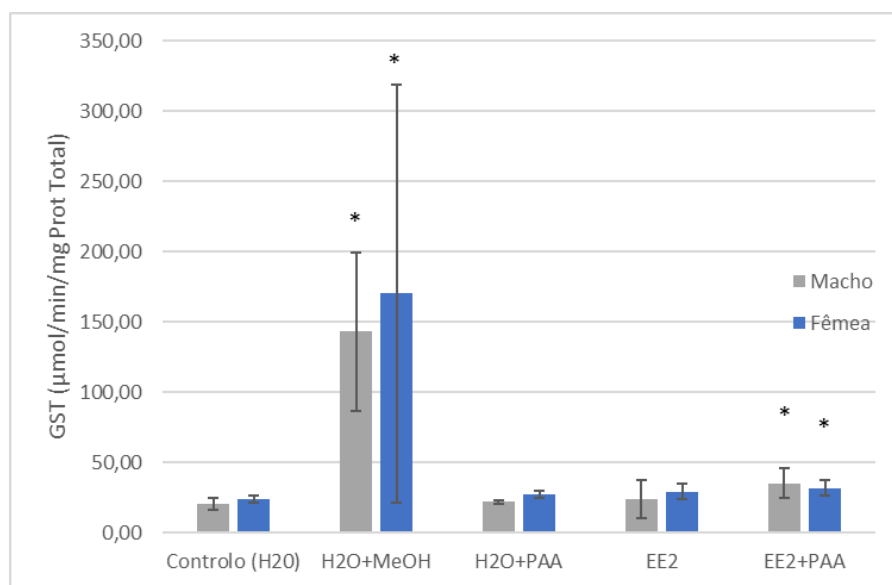


Figura 30 - Glutathione-s-transferase (GST) obtida em cada um dos grupos de ensaio.

Relativamente aos valores do biomarcador, os resultados mostraram que, tanto nos machos como nas fêmeas, os valores obtidos no controlo (1) apenas água (Controlo H₂O), são significativamente diferentes ($p < 0,05$; t-student), dos restantes ensaios, isto é, dos resultados obtidos nos peixes do tanque com metanol e água (H₂O+MeOH) e nos peixes do tanque na qual foram injetados o EE2 e o PAA (EE2+PAA). Verificou-se desta forma que houve um efeito na GST nestes organismos, que poderá estar associado a uma resposta do organismo ao aumento do stress oxidativo ou à presença de algum poluente.

No ensaio com água e metanol, (composto reconhecido como tóxico), parece existir um efeito negativo sobre a GST, enzima responsável pela biotransformação no fígado de certos poluentes e combate ao stress oxidativo, levando a pensar que este reagente apresenta um efeito negativo nos peixes. Contudo,

aquando dos ensaios de exposição ao EE2, a solução adicionada foi solubilizada em metanol, isto é, o EE2 foi diluído em metanol e como se pode observar, neste ensaio não foi verificado o mesmo efeito, especulando-se que os dois compostos juntos possam apresentar um efeito antagónico.

No grupo de exposição ao EE2+PAA verificou-se que existiu uma diferença significativa ($p < 0,05$; t-student) nos valores de GST entre o controlo e o valor de GST obtido para este grupo, no entanto, pode considerar-se que os efeitos provocados não são muito severos, não levando por exemplo, à mortalidade dos espécimes expostos. Considerando que, como não foi verificado esse efeito no ensaio com H₂O+PAA nem no ensaio apenas com EE2 poderá haver formação de um subproduto de reação entre o EE2 e o PAA, ou subproduto de degradação do PAA. Este efeito não terá de ser necessariamente prejudicial.

Catalase

Na Figura 31, mostram-se os resultados referentes ao biomarcador catalase - enzima antioxidante com a função de degradar ROS que possam surgir em caso de stress oxidativo.

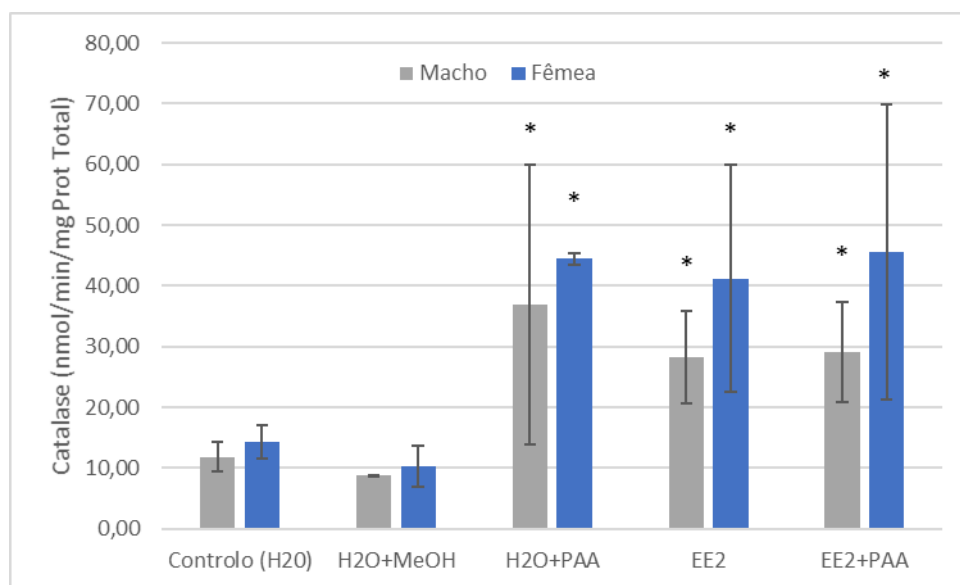


Figura 31 - Catalase (CAT) obtida em cada um dos grupos de ensaio.

Através da análise dos resultados obtidos, observou-se que os ensaios com H₂O+PAA, EE2 e EE2+PAA mostram diferenças significativas ($p < 0,05$; t-student) em comparação com o grupo controlo (H₂O). Verificou-se ainda que o efeito sobre a catalase foi elevado.

Nos ensaios com H₂O+PAA e EE2+PAA, o efeito do aumento verificado na enzima catalase poderá ser explicado pela degradação do PAA em peróxido de hidrogénio e pela formação de ROS no seu mecanismo de desinfeção - principais espécies contributivas de stress oxidativo.

Relativamente ao ensaio apenas com EE2 o efeito verificado poderá possivelmente ser explicado pelos efeitos tóxicos que o EE2 apresenta e que podem induzir a formação de ROS (Chen *et al.*, 2017), levando, por isso, a uma resposta por parte do organismo com a produção de catalase.

VTG

Na Figura 32 mostram-se os valores referentes à vitelogenina - biomarcador de desregulação endócrina.

A vitelogenina é uma proteína importante no ciclo reprodutivo das fêmeas, sendo por isso, expectável que apenas as fêmeas apresentem níveis positivos deste biomarcador.

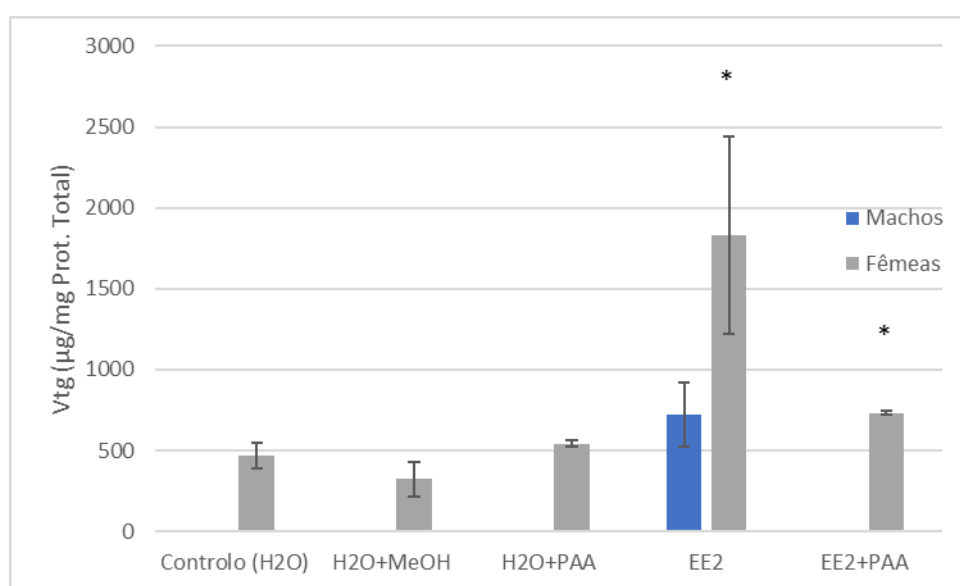


Figura 32 - Vitelogenina (VTG) obtida em cada um dos grupos de ensaio.

Da observação dos resultados obtidos, verifica-se que, nos machos o grupo de exposição EE2 foi o único que apresentou indução de VTG, confirmando-se, por isso, o poder estrogénico do EE2.

Nos grupos de fêmeas, a indução deste biomarcador foi considerada normal, contudo, verifica-se que o ensaio apenas com o EE2 e o ensaio com EE2+PAA apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$; t-student) quando comparadas com o controlo (H₂O). No ensaio com EE2, ocorreu uma intensificação na indução de produção de VTG, o que já era expectável devido à atividade estrogénica associado ao EE2.

Contudo, no ensaio com EE2+PAA, não se verificou indução provocada pelo EE2 nos machos, isto é, os valores de VTG obtidos são os normais para os machos. Estes resultados, bem como os obtidos nos ensaios de remoção de EE2 com adição de PAA, permitem concluir que o PAA parece eliminar o EE2 e a respetiva capacidade de desregulação endócrina.

No entanto, nas fêmeas foi verificado um acréscimo de VTG que, tendo em consideração a conclusão anterior, poderá significar que, após a reação entre o PAA e o EE2 houve a formação de subprodutos com capacidade de desregulação endócrina e que as fêmeas foram suscetíveis a estes subprodutos.

LPO

Os resultados obtidos de peroxidação lipídica mostram-se na Figura 33.

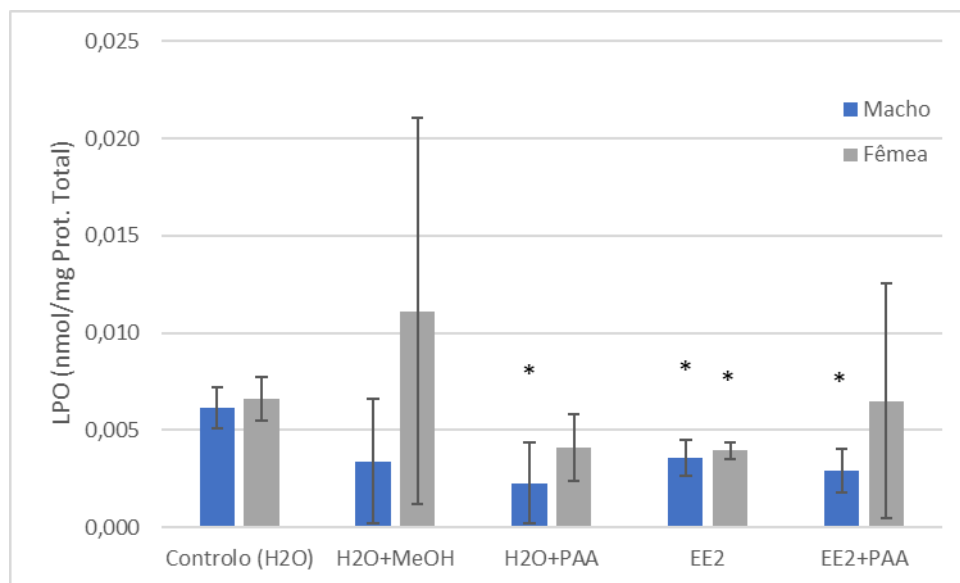


Figura 33 - Peroxidação lipídica (LPO) obtida em cada um dos grupos de ensaio.

Foi verificada, para o ensaio com H₂O+PAA e para os machos, uma diferença significativa ($p < 0,05$; t-student) relativamente ao controlo (H₂O), no entanto, neste ensaio o valor de LPO foi inferior ao registado no controlo.

No ensaio onde os peixes foram expostos ao EE2, tanto nos machos como nas fêmeas, foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$; t-student) relativamente ao controlo (H₂O), constatando-se também que os valores deste biomarcador foram mais baixos que os do controlo.

Nos ensaios com EE2+PAA, os machos apresentaram uma diferença significativa em relação ao controlo (H₂O), no entanto, também aqui os valores foram inferiores aos registados no controlo.

Da análise dos resultados obtidos, observou-se que no ensaio com H₂O+MeOH houve uma indução superior de LPO nas fêmeas, no entanto, não apresentou diferenças significativas com o controlo (H₂O).

Assim, parece poder concluir-se que nem o EE2 nem o PAA provocam induções negativas no biomarcador LPO, como tal, não existindo uma destruição celular prejudicial aos organismos.

Mortalidade

Não foi observada mortalidade significativa durante os ensaios ecotoxicológicos realizados.

Contrariamente ao demonstrado, da Costa *et al.* (2014), após ensaios de desinfecção com PAA (5 mg.L⁻¹ durante 20 minutos), verificou diminuições estatisticamente significativas na sobrevivência (50% de mortalidade) de *D. rerio* exposto a amostras de efluentes tratadas quando comparados com as amostras de efluentes não desinfetadas e com o controle.

No entanto, da Costa *et al.* (2014) não verificou alterações significativas na toxicidade da água residual tratada com PAA para *Ceriodaphnia silvestrii* ($p > 0,05$, Fisher Test).

Ao longo dos ensaios realizados, da Costa *et al.* (2014), estudou os efeitos de diferentes desinfetantes, considerando, após o estudo, que o cloro é o desinfetante mais tóxico para os organismos, seguido pelo ozono, radiação UV e por último, PAA.

8. Conclusões

Considerando o trabalho desenvolvido e os resultados obtidos ao longo deste estudo, as principais conclusões foram:

- O ácido peracético é um desinfetante eficaz na remoção do composto EE2;
- As concentrações de 10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹ de PAA para os tempos de contacto de 10 minutos e 20 minutos, respetivamente, apresentam remoções de EE2 na ordem dos 100%.
- Em termos de ensaios ecotoxicológicos, os valores obtidos para VTG demonstraram que não houve indução deste biomarcador após o tratamento com PAA, parecendo comprovar a sua capacidade de remoção de EE2 e da capacidade de desregulação endócrina associada.
- Através dos biomarcadores de stress oxidativo, foi observável tanto na GST como na Catalase a indução destes antioxidantes, no entanto, estas parecem não provocar efeitos severos nos organismos.
- A aplicabilidade do PAA parece ser uma via alternativa ao cloro, tendo em conta todas as suas características, custos e resultados obtidos neste estudo, contudo é necessária a realização de mais estudos que comprovem a sua baixa toxicidade para os organismos aquáticos e avaliação de possíveis subprodutos produzidos.

9. Desenvolvimentos futuros

Com este estudo foi possível estudar a remoção de EE2 recorrendo ao oxidante PAA. Esta opção parece ser viável e poderá representar uma possível alternativa ao cloro como desinfetante, desta forma, seria interessante dar continuidade a este estudo e verificar melhor alguns pontos, nomeadamente:

- Avaliar a capacidade de desinfecção do PAA para as dosagens estudadas, que apesar da literatura existente afirmar a sua eficiência na remoção microbiológica, é necessário verificar a remoção de coliformes fecais e totais e quais as melhores doses e tempos de contacto a aplicar;
- Realizar mais ensaios de remoção de EE2 com adição de PAA, de modo a corroborar os resultados obtidos, com diferentes matrizes de água residual, uma vez que a cinética do PAA varia de acordo com diferentes características da água; avaliando o seu poder de oxidação dos compostos em águas com diferentes características;
- Realizar mais ensaios ecotoxicológicos e histológicos de modo a aferir a toxicidade ou inocuidade do PAA e aplicar estes ensaios em matriz real, de modo a verificar, se o PAA ao reagir com a água residual produz algum subproduto prejudicial aos organismos aquáticos;
- Realizar os ensaios de remoção e ensaios ecotoxicológicos com características o mais reais possível, ou seja, com soluções mistas de compostos de modo a aferir remoções e sinergias que possam surgir com a aplicação do PAA;
- Identificar e quantificar subprodutos produzidos da reação do PAA com EE2 e com a água residual;
- Aferir as condições estudadas à escala piloto;
- Estudar a aplicabilidade deste processo de tratamento em ETA ou água potável uma vez que a quantificação de EE2 ocorre em água utilizada para o abastecimento potável.

10. Bibliografia

- Acero, J. L., Benitez, F. J., Real, F. J., Roldan, G., & Rodriguez, E. (2013). **Chlorination and bromination kinetics of emerging contaminants in aqueous systems**. *Chemical Engineering Journal*, 219, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.067>
- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017). **Environmental impact of estrogens on human , animal and plant life : A critical review**. *Environment International*, 99, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- Agency, E. E. (2017). Commission Decision 2455/2001/EC. Retrieved December 12, 2016, from <https://www.eea.europa.eu/policy-documents/commission-decision-2455-2001-ec>
- Almeida, C., & Nogueira, J. M. F. (2006). **Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1303–1311. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.037>
- Alves, C. (2010). **Tratamento de Águas de Abastecimento** (3ª Edição, pp. 49–62). Publindústria, Edições Técnicas.
- Ambiente, A. P. do. (2017). ambiente Portugal. Retrieved December 20, 2017, from <http://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=7&sub2ref=818&sub3ref=1246>
- Amoatey, P., & Bani, R. (2011). **Wastewater management**. In *Waste Water - Evaluation and Management*.
- Aparicio, I., Martín, J., Santos, J. L., Malvar, J. L., & Alonso, E. (2017). **Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of polar and non-polar emerging and priority pollutants in environmental waters**. *Journal of Chromatography A*, 12–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.007>
- Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S., & Praveena, S. M. (2014). **Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review**. *Environment International*, 69, 104–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011>
- Aufartová, J., Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., Nováková, L., & Solich, P. (2011). **Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview**. *Analytica Chimica Acta*, 704(1–2), 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.030>
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., & Cramers, C. (1999). **Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles**. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737–747. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-667x\(1999\)11:10<737::aid-mcs7>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-667x(1999)11:10<737::aid-mcs7>3.0.co;2-4)
- Barbosa, M. O., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2016). **Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision**

- 2015/495. *Water Research*, 94, 257–279. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>
- Barreiros, L., Queiroz, J. F., Magalhães, L. M., Silva, A. M. T., & Segundo, M. A. (2016). **Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review** ☆. *Microchemical Journal*, 126, 243–262. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.003>
- Baumann, L., Knörr, S., Keiter, S., Rehberger, K., Volz, S., Schiller, V., ... Braunbeck, T. (2014). **Reversibility of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) after discontinued exposure to the estrogen 17 α -ethinylestradiol**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(3), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.025>
- Ben Fredj, S., Nobbs, J., Tizaoui, C., & Monser, L. (2014). **Removal of estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and 17 α -ethinylestradiol (EE2) from wastewater by liquid-liquid extraction**. *Chemical Engineering Journal*, 262, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.007>
- Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., & Zoeller, R. T. (2012). **State of the science of endocrine disrupting chemicals**, 2012. *Toxicology Letters* (Vol. 211). <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.020>
- Bhatt, T. (2016). **Peracetic acid: an emerging wastewater disinfectant**.
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências**. *Química Nova*, 30(3), 651–666. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300027>
- Birkett, J. W., & Lester, J. N. (2003). **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes**. America. Lewis Publishers.
- Block, P. (2016). **The Decomposition Kinetics of Peracetic Acid and Hydrogen Peroxide in Municipal Wastewaters**. Philadelphia.
- Block, P., Reimers, R., & Xu, Y. (2015). **Use of Peracetic Acid as a Wastewater Disinfectant to Eliminate the Formation of Chlorinated Disinfection By-products and Inhibit the Activity of Endocrine Disrupting Compounds**. *WEFTEC 2015 Proceedings*, 528–535. <https://doi.org/10.2175/193864715819555328>
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., & Matsuura, T. (2009). **A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal**. *Desalination*, 238(1–3), 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
- Boshir, M., Zhou, J. L., Hao, H., Guo, W., Thomaidis, N. S., & Xu, J. (2017). **Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater : A critical review**. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 274–298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045>
- Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding**. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Camino-Sánchez, F. J., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Santos-Fandila, A., & Vilchez, J. L.

- (2014). **Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends.** *Talanta*, 130, 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.022>
- Cavallini, G. S., De Campos, S. X., De Souza, J. B., & De Sousa Vidal, C. M. (2013). **Evaluation of the physical-chemical characteristics of wastewater after disinfection with peracetic acid.** *Water, Air, and Soil Pollution*, 224(10). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1752-5>
- Chambel, M. (2011). **Contribuição para o estudo da remoção em ETAR de 17 β - estradiol e de 17 α - etinilestradiol no tratamento biológico.**
- Chang, R. (n.d.). **Química** (Oitava Edi). McGraw-Hill.
- Chen, Y., Li, M., Yuan, L., Xie, Y., Li, B., Xu, W., ... Wang, R. (2017). **Growth , blood health , antioxidant status and immune response in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to α -ethinylestradiol (EE2).** *Fish and Shellfish Immunology*, 69, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.003>
- Chhetri, R. K., Bonnerup, A., & Andersen, H. R. (2016). **Combined Sewer Overflow pretreatment with chemical coagulation and a particle settler for improved peracetic acid disinfection.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 37, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.03.049>
- Chhetri, R. K., Klupsch, E., Andersen, H. R., & Jensen, P. E. (2017). **Treatment of Arctic wastewater by chemical coagulation, UV and peracetic acid disinfection.** *Environmental Science and Pollution Research*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8585-5>
- Chhetri, R. K., Thornberg, D., Berner, J., Gramstad, R., Öjstedt, U., Sharma, A. K., & Andersen, H. R. (2014). **Chemical disinfection of combined sewer overflow waters using performic acid or peracetic acids.** *Science of the Total Environment*, 490, 1065–1072. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.079>
- Chust, R. B. (1990). **Introdução Cromatografia de Líquidos**, 43–54.
- Correia, R. (2016). **Contribuição para o estudo da degradação do 17 β -Estradiol e do 17 α -Etinilestradiol com recurso ao tratamento de discos biológicos em batch.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária.
- Council, A. (2010). **Estrogenic Endocrine Disrupting Compounds Review and Analytical Procedures for GC-MS and ELISA Analyses** (Vol. 504)
- Crawford, G., Hurrell, P., Paroschy, K., & Pereira, C. (2017). **Pharmaceuticals and other Endocrine Disrupting Compounds in Natural Water Systems**, (April).
- da Costa, J. B., Rodgher, S., Daniel, L. A., & Espíndola, E. L. G. (2014). **Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone and UV radiation.** *Ecotoxicology*, 23(9), 1803–1813. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1346-z>
- Danielsson, L., & Zhang, Y. (1996). **Methods for determiningn-octanol-water partition constants.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(4), 188–196. <https://doi.org/10.1016/0165->

- de Mes, T., Zeeman, G., & Lettinga, G. (2005). **Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater.** *Reviews in Environmental Science and Bio/technology*, (4), 275–311. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-3216-2>
- De Rudder, J., Van De Wiele, T., Dhooge, W., Comhaire, F., & Verstraete, W. (2004). **Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2).** *Water Research*, 38(1), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.018>
- Degremont. (1991). **Water treatment Handbook** (sixth edit).
- Dell'Erba, A., Falsanisi, D., Liberti, L., Notarnicola, M., & Santoro, D. (2007). **Disinfection by-products formation during wastewater disinfection with peracetic acid.** *Desalination*, 215(1–3), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.08.021>
- Dias, R. M. (2017). **Contribuição para o estudo da remoção biológica simultânea do 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinylestradiol num reator de discos biológicos.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária.
- Diniz, M. S., Maurício, R., Petrovic, M., De Alda, M. J. L., Amaral, L., Peres, I., ... Santana, F. (2010). **Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach.** *Journal of Environmental Sciences*, 22(10), 1613–1622. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60297-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60297-7)
- Diniz, M. S., Peres, I., & Pihan, J. C. (2005). **Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (Cyprinus carpio) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons.** *Science of the Total Environment*, 349(1–3), 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.014>
- Diniz, M. S., Salgado, R., Pereira, V. J., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M. A. M., & Noronha, J. P. (2015). **Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (Danio rerio).** *Science of the Total Environment*, 505, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.103>
- Eckert, K., & Eckert, K. P. (2013). **Disinfection Performance of Peracetic Acid in Florida Wastewater Reuse Applications**, University of North Florida, Theses and Dissertations, Paper 446.
- Fernandes, S. (2016). **Contribuição para o Estudo da Remoção Biológica de 17 β -estradiol em Águas Residuais.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil Engenharia Sanitária.
- Fernandes, S. (2016). **Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em cereais e café no Laboratório da SGS Portugal.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar.

- Fernandes, T. J. M. (2012). **Contribuição para o estudo da presença de disruptores endócrinos em lamas de ETAR.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária.
- Gagnon, C., Lajeunesse, A., Cejka, P., Gagné, F., & Hausler, R. (2008). **Degradation of Selected Acidic and Neutral Pharmaceutical Products in a Primary-Treated Wastewater by Disinfection Processes.** *Ozone: Science & Engineering*, 30(5), 387–392. <https://doi.org/10.1080/01919510802336731>
- Gervais, G., Bichon, E., Antignac, J., Monteau, F., & Leroy, G. (2013). **Chemosphere Differential global profiling as a new analytical strategy for revealing micropollutant treatment by-products : Application to ethinylestradiol and chlorination water treatment**, 83(2011), 1553–1559. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.027>
- Gore, A. C., Crews, D., Doan, L. orett. L., La Merrill, M., Patisaul, H., & Zota, A. (2014). **Introduction to Endocrine disrupting Chemicals (EDCs)-A Guide for Public interest Organizations and Policy-markers.** *Endocrine Society*, (December), 76.
- Graham, M. S., Lomax, G., & Skipp, G. (2012). **Peracetic Acid (PAA) versus Chlorination / Dechlorination – A Disinfection Comparison**, Public Works Department, City of St . Augustine, Florida.
- Greenberg, A. E., Trussell, R. R., Clesceri, L. S., American Public Health Association., American Water Works Association., & Water Pollution Control Federation. (1985). **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 1268. <https://doi.org/30M11/98>
- Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-esponda, S., Sosa-ferrera, Z., & Santana-rodríguez, J. J. (2014). **Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems.** *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 3–4, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.10.001>
- Guerreiro, H. (n.d.). Diários da República. Retrieved January 7, 2018, from <https://dre.tretas.org/dre/94857/decreto-lei-236-98-de-1-de-agosto>
- Guerreiro, H. (2005). Diários da República. Retrieved December 20, 2017, from <https://dre.tretas.org/dre/192805/lei-58-2005-de-29-de-dezembro>
- Habig WH, Pabst MJ, J. W. (1974). **Glutathione S-transferases—first enzymatic step in mercapturic acid formation.** *J Biol Chem*.
- Hamid, H., & Eskicioglu, C. (2012). **Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix.** *Water Research*, 46(18), 5813–5833. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.002>
- Hong, T. A. (2012). **The YES assay as a tool to analyse endocrine disruptors in different matrices in Vietnam.**

- Huang, X., Yuan, D., & Huang, B. (2008). **Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection.** *Talanta*, 75(1), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.052>
- Huber, L. (2010). *Validation of Analytical Methods*, Agilent Technologies
- Huber, P. C., Almeida, W. P., & Fátima, Â. d. (2008). **Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes.** *Química Nova* 31.5.
- Ifelebuegu, A. O. (2011). **The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals in full scale wastewater and sludge treatment unit processes.** *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8 (2), 245–254. <https://doi.org/10.1007/BF03326213>
- Iparraguirre, A., Prieto, A., Navarro, P., Olivares, M., Fernández, L. Á., & Zuloaga, O. (2011). **Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(1), 339–352. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5074-4>
- Isabel, S., & Miranda, M. (2014). **Remoção de Fármacos de Águas Contaminadas . Avaliação de vários Substratos.** Universidade de Évora, Dissertação apresentada na Universidade de Évora para obtenção do Grau de Mestre em Análises Químicas Ambientais
- Jewell, K. P., & Wilson, J. T. (2011). **Water level monitoring pressure transducers : a need for industry-wide standards.** *Ground Water Monitoring & Remediation*, 31(3), 82–94. <https://doi.org/10.1111/j.1745>
- Jiang, Y., Zhang, X., Tang, T., Zhou, T., & Shi, G. (2015). **Environmental Analysis Determination of Endocrine Disruptors in Environmental Water by Single-Drop Microextraction and High-Performance Liquid Chromatography,** (August 2014), 710–725. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.958768>
- Johansson, L. H., & Borg, L. A. H. (1988). **A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples.** *Anal. Biochem.* 174, 331–336.
- Johnson, A. C., & Williams, R. J. (2004). **A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works.** *Environmental Science and Technology*, 38(13), 3649–3658. <https://doi.org/10.1021/es035342u>
- Jones, S. M., Chowdhury, Z. K., & Watts, M. J. (2017). **A taxonomy of chemicals of emerging concern based on observed fate at water resource recovery facilities.** *Chemosphere*, 170, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.075>
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). **A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Karpova, T., Pekonen, P., Gramstad, R., Öjstedt, U., Laborda, S., Heinonen-Tanski, H., ... Jiménez, B.

- (2013). **Performic acid for advanced wastewater disinfection**. *Water Science and Technology*, 68(9), 2090–2096. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.468>
- Kitis, M. (2004). **Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review**. *Environment International*, 30(1), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00147-8)
- Koh, Y. K. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2008). **Treatment and Removal Strategies for Estrogens From Wastewater**. *Environmental Technology*, 29(3), 245–267. <https://doi.org/10.1080/09593330802099122>
- Kozłowska-Tylingo, K., Namieśnik, J., & Górecki, T. (2010). **Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples—A Review of Chromatographic Methods**. In *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (Vol. 40, pp. 194–201). <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.490488>
- Laurenson, J. P., Bloom, R. a, Page, S., & Sadrieh, N. (2014). **Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk assessment data**. *The AAPS Journal*, 16(2), 299–310. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9561-3>
- Lazarova, V., Janex, M. L., Fiksdal, L., Oberg, C., Barcina, I., & Pommepuy, M. (1998). **Advanced wastewater disinfection technologies: Short and long term efficiency**. *Water Science and Technology*, 38(12), 109–117. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00810-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00810-5)
- Lee, J., Lee, B. C., Ra, J. S., Cho, J., Kim, I. S., Chang, N. I., ... Kim, S. D. (2008). **Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes**. *Chemosphere*, 71(8), 1582–1592. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.021>
- Leite, A. (2014). **Desinfecção de Efluentes Urbanos através de Doseamento de Cloro**. Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil Engenharia Sanitária.
- Leverenz, H. (2006). **Evaluation of Disinfection Units for Onsite Wastewater Treatment Systems**.
- Liu, D., Straus, D. L., Pedersen, L. F., & Meinelt, T. (2017). **Pulse versus continuous peracetic acid applications: Effects on rainbow trout performance, biofilm formation and water quality**. *Aquacultural Engineering*, 77, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2017.03.004>
- Liu, D., Wu, S., Xu, H., Zhang, Q., Zhang, S., Shi, L., ... Cheng, J. (2017). **Distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in water, sediment and fishes in a shallow Chinese freshwater lake: Implications for ecological and human health risks**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140(February), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.045>
- Liu, Y. H., Zhang, S. H., Ji, G. X., Wu, S. M., Guo, R. X., Cheng, J., ... Chen, J. Q. (2017). **Occurrence, distribution and risk assessment of suspected endocrine-disrupting chemicals in surface water and suspended particulate matter of Yangtze River (Nanjing section)**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.035>

- Locatelli, M., Sciascia, F., Cifelli, R., Malatesta, L., Bruni, P., & Croce, F. (2016). **Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples.** *Journal of Chromatography A*, 1434, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.034>
- Lofrano, G. (2012). **Green Technologies for Wastewater Treatment Energy recovery and emerging compounds removal.**
- Luukkonen, T., & Pehkonen, S. O. (2016). **Peracids in water treatment: A critical review.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 0(0), 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643389.2016.1272343>
- Luukkonen, T., Teeriniemi, J., Prokkola, H., Rämö, J., & Lassi, U. (2014). **Chemical aspects of peracetic acid based wastewater disinfection.** *Water SA*, 40(1), 73–80. <https://doi.org/10.4314/wsa.v40i1.9>
- Luzio, A., Monteiro, S. M., Rocha, E., Fontainhas-Fernandes, A. A., & Coimbra, A. M. (2016). **Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (Danio rerio) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17 α -ethinylestradiol and fadrozole).** *Aquatic Toxicology*, 175, 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.014>
- Madeira, D., Mendonça, V., Vinagre, C., & Diniz, M. S. (2016). **Is the stress response affected by season? Clues from an in situ study with a key intertidal shrimp.** *Marine Biology*.
- Mallozzi, M., Leone, C., Manurita, F., Bellati, F., & Caserta, D. (2017). **Endocrine disrupting chemicals and endometrial cancer: An overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph14030334>
- Mara, D. (2003). **Domestic Wastewater Treatment in Developing Countries.**
- Matthiessen, P., Wheeler, J. R., & Weltje, L. (2017). **A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations.** *Critical Reviews in Toxicology*, 0(0), 1–22. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1397099>
- McFadden, M., Loconsole, J., Schockling, A. J., Nerenberg, R., & Pavissich, J. P. (2017). **Comparing peracetic acid and hypochlorite for disinfection of combined sewer overflows: Effects of suspended-solids and pH.** *Science of The Total Environment*, 599–600, 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.179>
- Metcalf, E., & Eddy, H. (2003). **Wastewater engineering: treatment and reuse.** *Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited*, 4th edition. New Delhi, India. [https://doi.org/10.1016/0309-1708\(80\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0309-1708(80)90067-6)
- Monte, H. M. do, & Albuquerque, A. (2010). **Reutilização de Águas Residuais.**
- Moriyama, K., Matsufuji, H., Chino, M., & Takeda, M. (2004). **Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethinylestradiol.** *Chemosphere*, 55(6), 839–847.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.045>

- Nogueira, J. M. F. (2015). **Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.002>
- Nollet, Leo M.L.; Lambropoulou, D. A. (2017). **Chromatographic Analysis of the Environment - Mass Spectrometry Based Approaches** (Fourth Edi).
- Noutsopoulos, C., Mamais, D., Mpouras, T., Samaras, V., Antoniou, K., & Gioldasi, M. (2014). **The role of activated carbon and disinfection on the removal of endocrine disrupting chemicals and non-steroidal anti-inflammatory drugs from wastewater,** 3330(March 2017). <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.846923>
- Noutsopoulos, C., Mamais, D., Samaras, V., Bouras, T., Marneri, M., & Antoniou, K. (2013). **Effect of wastewater chlorination on endocrine disruptor removal.** *Water Science and Technology*, 67(7), 1551–1556. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.025>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** 95, 351–358. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Pan, S., An, W., Li, H., Su, M., Zhang, J., & Yang, M. (2014). **Cancer risk assessment on trihalomethanes and haloacetic acids in drinking water of China using disability-adjusted life years.** *Journal of Hazardous Materials*, 280, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.080>
- Patisaul, H. B., & Belcher, S. M. (2017). **Endocrine Disruptors, Brain and Behaviour.** Oxford University Press.
- Pereira, R. O., Postigo, C., de Alda, M. L., Daniel, L. A., & Barceló, D. (2011). **Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products.** *Chemosphere*, 82(6), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.082>
- Pereira, V. J., Galinha, J., Barreto Crespo, M. T., Matos, C. T., & Crespo, J. G. (2012). **Integration of nanofiltration, UV photolysis, and advanced oxidation processes for the removal of hormones from surface water sources.** *Separation and Purification Technology*, 95, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.04.013>
- Pintado-Herrera, M. G., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. A. (2014). **Atmospheric pressure gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry (APGC-ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE).** *Analytica Chimica Acta*, 851(C), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.030>
- Plahuta, M., Tisler, T., Toman, M. J., & Pintar, A. (2017). **Toxic and endocrine disrupting effects of wastewater treatment plant influents and effluents on a freshwater isopod Asellus aquaticus (Isopoda, Crustacea).** *Chemosphere*, 174, 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.137>

- Prasse, C., Stalter, D., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., & Ternes, T. A. (2015). **A critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies.** *Water Research*, 87, 237–270. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.023>
- Qasim, S. R. (1994). **Wastewater Treatment Plants: Planning, Design, and Operation.** Technomic Publishing Company, Inc.
- Queiroz, M. E. C. (2009). **Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas.** *Scientia Chromatographica*, 21–29.
- Ragazzo, P., Feretti, D., Monarca, S., Dominici, L., Ceretti, E., Viola, G., ... Villarini, M. (2017). **Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid.** *Water Research*, 116, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.016>
- Rahman, M. F., Yanful, E. K., & Jasim, S. Y. (2009). **Endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment: Implications for the drinking water industry and global environmental health.** *Journal of Water and Health*, 7(2), 224–243. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.021>
- Reis Filho, R. W., De Araújo, J. C., & Vieira, E. M. (2006). **Hormônios sexuais estrógenos: Contaminantes bioativos.** *Química Nova*, 29(4), 817–822. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400032>
- Ribeiro, V. (2017). **Contribuição para o estudo da remoção de 17β-Estradiol e 17α-Etinilestradiol em água residual tratada em discos biológicos.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária.
- Rosa, R. M. R. (2008). **Contribuição para o estudo de compostos desreguladores endócrinos(EC) em ETAR.**
- Santoro, D., Gehr, R., Bartrand, T. A., Liberti, L., Notarnicola, M., Dell'Erba, A., ... Haas, C. N. (2007). **Wastewater Disinfection by Peracetic Acid: Assessment of Models for Tracking Residual Measurements and Inactivation.** *Water Environment Research*, 79(7), 775–787. <https://doi.org/10.2175/106143007X156817>
- Saraiva, S. (2015). **Avaliação da eficiência da desinfecção de efluentes urbanos com recurso a cloro.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil Engenharia Sanitária.
- Sarathy, S., Murray, A., Neofostistos, P., Walton, J., Lawryshyn, Y., & Santoro, D. (2016). **Disinfection of a municipal wastewater secondary effluent with a combination of ultraviolet irradiation and peracetic acid,** (January), 2053–2064. <https://doi.org/10.2175/193864716819707751>
- Shannon, M. A., Bohn, P. W., Elimelech, M., Georgiadis, J. G., Mariñas, B. J., & Mayes, A. M. (2008). **Science and technology for water purification in the coming decades.** *Nature*, 452(7185), 301–310. <https://doi.org/10.1038/nature06599>

- Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). **Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods.** *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Silva, A. (2016). **Validação de Métodos Analíticos para controlo de Qualidade de um Medicamento , por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica.
- Silva, C. (2014). **Ocorrência e destino de estrogénios e antibióticos no ambiente, avaliados por metodologias analíticas de baixo custo.** Universidade de Aveiro, Departamento de Química, Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química. Retrieved from <https://ria.ua.pt/handle/10773/7026>
- Silva, M. (2016). **Determinação da concentração de mercúrio , e outros elementos traço , em tecidos de peixe-zebra (Danio rerio).**
- Silva, P. (2011). **Efeitos combinados de desreguladores endócrinos em Daphnia magna.** Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.
- Silva, S. (2010). **Estudo da Cinética de Decomposição de Soluções de Ácido Peracético Contaminadas com Material Orgânico.** Dissertação apresentada à Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário Instituto Mauá de Tecnologia para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.
- Silva, T. (2015). **Relatório de Atividade Programa de Introdução à Prática Profissional.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- Singh, B., Kumar, A., & Malik, A. K. (2014). **Recent advances in sample preparation methods for analysis of endocrine disruptors from various matrices.** In *Critical reviews in analytical chemistry* (Vol. 44, pp. 255–69). <https://doi.org/10.1080/10408347.2013.859981>
- Soeiro, P., & Ferreira, M. (2013). **Disruptores Endócrinos.**
- Spietelun, A., Marcinkowski, Ł., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2013). **Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry.** *Journal of Chromatography A*, 1321, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.030>
- Sun, Y., Yin, Y., Zhang, J., Yu, H., Wang, X., Wu, J., & Xue, Y. (2008). **Hydroxyl radical generation and oxidative stress in Carassius auratus liver, exposed to pyrene.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71.2.
- Ting, Y. F., & Praveena, S. M. (2017). **Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review.** *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5890-x>

- Valormed. (2015). **Seleção dos Fármacos para o Projecto de Investigação e Desenvolvimento.**
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., & Zambello, E. (2012). **Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment - A review.** *Science of the Total Environment*, 429, 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
- Vicente, A. (2016). **Contribuição para o Estudo da Remoção do Fármaco 17 α -Ethinilestradiol de Água Residual Urbana Tratada com Recurso ao Processo de Discos Biológicos.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária.
- Victoria, E. (2002). **Guidelines for Environmental Management - Disinfection of Treated Wastewater.** EPA Victoria Australia.
- Vilela, C. L. S., Bassin, J. P., & Peixoto, R. S. (2018). **Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection.** *Environmental Pollution*, 235, 546–559. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.098>
- Wagner, M., Brumelis, D., & Gehr, R. (2002). **Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent.** *Water Environment Research: A Research Publication of the Water Environment Federation*, 74(1), 33–50. <https://doi.org/10.2175/106143002X139730>
- Wang, L.-S., Wang, L., Wang, L., Wang, G., Li, Z.-H., & Wang, J.-J. (2009). **Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings.** *Environmental Toxicology*, 24(3), 296–303. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Wee, S. Y., & Aris, A. Z. (2017). **Endocrine disrupting compounds in drinking water supply system and human health risk implication.** *Environment International*, 106(January), 207–233. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.004>
- Wheeler, C. R., Salzman, J. A., & Elsayed, N. M. (1990). **Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity.** *Anal. Biochem.* 184, 193–199.
- WHO. (2017). Media centre. Retrieved January 5, 2018, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>
- WHO. (2018). Global Health Observatory (GHO) data. Retrieved January 5, 2018, from http://www.who.int/gho/mdg/environmental_sustainability/sanitation_text/en/
- Windsor, F. M., Ormerod, S. J., & Tyler, C. R. (2017). **Endocrine disruption in aquatic systems: up-scaling research to address ecological consequences.** *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/brv.12360>
- Wise, A., O'Brien, K., & Woodruff, T. (2011). **Are oral contraceptives a significant contributor to the**

estrogenicity of drinking water? *Environmental Science and Technology*, 45(1), 51–60.
<https://doi.org/10.1021/es1014482>

Wooding, M., Rohwer, E. R., & Naudé, Y. (2017). **Determination of endocrine disrupting chemicals and antiretroviral compounds in surface water: A disposable sorptive sampler with comprehensive gas chromatography - Time-of-flight mass spectrometry and large volume injection with ultra-high performance.** *Journal of Chromatography A*, 1496, 122–132.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.057>

Zhang, S., You, J., Sun, Z., Song, C., Ning, S., Zhao, C., & Suo, Y. (2012). **A sensitive method for extraction and determination of endocrine-disrupting compounds from wastewater using 10-ethyl-acridone-2-sulfonyl chloride as pre-column labeling reagent by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** *Microchemical Journal*, 103, 90–96.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.01.009>

Anexos

Contribuição para o Estudo da Remoção do Composto 17 α -Etinilestradiol de uma Água Residual Urbana Tratada através da adição de Ácido Peracético

Semedo, Flávia*; Maurício, Rita; Noronha, João Paulo; Diniz Mário

*Autor Correspondente, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal
E-mail: f.semedo@campus.fct.unl.pt

Introdução

A "Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA)" definiu Compostos Desreguladores Endócrinos (EDC) como agentes exógenos que interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação, ou eliminação de hormonas naturais responsáveis pela manutenção da homeostasia e reprodução nos seres vivos.¹

As hormonas, naturais e sintéticas (ex: EE2) são reconhecidos como os EDC com maior atividade estrogénica, mesmo quando presentes em concentrações muito baixas, sendo a sua presença no ambiente um foco de atenção e prioridade global.²

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi o estudo da aplicabilidade da remoção do composto 17 α – Etinilestradiol de águas residuais urbanas através de um processo oxidativo recorrendo à adição do Ácido Peracético (PAA).

Materiais e Métodos

Foram realizados ensaios Jar-test para avaliar as eficiências de remoção do EE2 com a adição do PAA, estudando diferentes concentrações e tempos de contacto. As eficiências de remoção de EE2, foram obtidas recorrendo ao método descrito na figura 2. Tendo sido ainda avaliada a respectiva toxicidade, através de ensaios biológicos *in vivo*, usando *Danio rerio* como modelo biológico. Para a realização do trabalho laboratorial proposto seguiram-se as etapas abaixo apresentadas:

Remoção do composto

Ensaios Jar-test para remoção do EE2
• Matriz: Água residual
• Velocidade de agitação: 200 rpm
• Concentração EE2 na amostra: 50ppb
• Dosagens de PAA: 1,5,10 e 15 mg/L
• Tempos de contacto:
• Ensaio 1 - 10 minutos
• Ensaio 2 - 15 minutos
• Ensaio 3 - 20 minutos

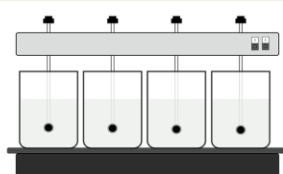


Figura 1 – Equipamento Jar-test.



Ensaios Biológicos

Determinação de biomarcadores de stress oxidativo (GST e CAT) e de desregulação endócrina (VTG)
• Matriz: Água residual
• Duração do ensaio: 7 dias
• 4 tanques de 10 L com Água desmineralizada e 4 exemplares de *Danio rerio* em cada tanque
• Mudança do meio de 48h em 48h, com contaminação do meio

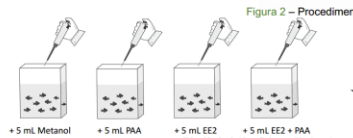


Figura 3 – Ensaios de exposição dos *Danio* ao EE2

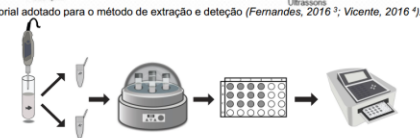


Figura 4 – Procedimento experimental adoptado nos bioensaios.

Resultados

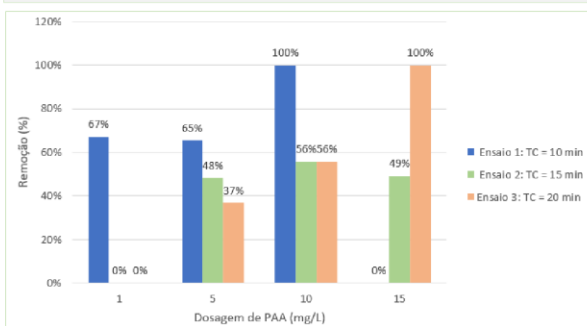


Figura 5 – Eficiências de remoção de EE2 com a adição de PAA.

Conclusões

Através deste estudo foi possível concluir que o PAA é um oxidante que poderá ser aplicado na remoção do composto EE2 em água residuais urbanas, uma vez que:

- Foram verificadas eficiências de remoção do EE2 na ordem dos 100%, para as concentrações de 10 e 15 mg/L, com tempos de contacto de 15 e 20 min, respetivamente;
- Não ocorreram alterações significativas na atividade das enzimas antioxidantes, nem indução da VTG quando aplicado o oxidante, demonstrando a sua eficiência na remoção do 17 α – Etinilestradiol.

Tabela 1 – Níveis de Vitelogenina (VTG). nd: não detetado

	Machos		Fêmeas	
	Média	Desv. padrão	Média	Desv. padrão
Controlo (Água + Metanol)	nd	nd	554,9	14,8
Controlo (Água + PAA)	nd	nd	437,4	-
EE2	766,4	113,1	1924,9	44,5
EE2+PAA	nd	nd	639,9	9,2

Tabela 2 – Valores referentes à enzima de stress oxidativo Glutationa-S-transferase (GST).

	GST (μ mol/mL/min)	Act. Especifica (nmol/min/mg)
Controlo (Água + PAA)	23,21	24,98
EE2	24,35	26,13
EE2 + PAA	32,22	36,63

Tabela 3 – Valores referentes à enzima de stress oxidativo Catalase (CAT).

	CAT (nmol/min/mL)	Act. Especifica (nmol/min/mg)
Controlo (Água + PAA)	27,89	31,20
EE2	24,95	26,83
EE2 + PAA	25,30	28,65

Bibliografia

¹ Nollet, Leo M.L.; Lambropoulou, D. A. (2017). *Chromatographic Analysis of the Environment - Mass Spectrometry Based Approaches* (Fourth Ed); ² Ting, Y. F., & Praveena, S. M. (2017). Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(4); ³ Fernandes, S. (2016). *Contribuição para o Estudo da Remoção Biológica de 17 β -estradiol em Águas Residuais*. Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil Engenharia Sanitária; ⁴ Vicente, A. (2016). *Contribuição para o Estudo da Remoção do Fármaco 17 α -Etinilestradiol de Água Residual Urbana Tratada com Recurso ao Processo de Discos Biológicos*. Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária.

Agradecimentos: Estudo desenvolvido no CENSE, financiado pelo Projeto Estratégico Pest-OE/AMB/UI4085/2013 da Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) e financiado pela Valormed.

Anexo II - Certificado de participação no 16º Encontro Nacional de Ecologia



Certificado

Para os devidos efeitos confirma-se que

Flávia Semedo

participou no 16º Encontro Nacional de Ecologia, que teve lugar em Lisboa
(Portugal) nos dias 09 e 10 de Novembro de 2017,

com a seguinte comunicação:

**Contribuição para o Estudo da Remoção do Composto 17 α -
Ethinilestradiol de uma Água Residual Urbana Tratada através da
adição de Ácido Peracético**

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Maria Amélia Martins-Loução".

Maria Amélia Martins-Loução

Faculdade de Ciências de Lisboa. Campo Grande • Edif. C4, Piso 1, Sala 4.1.10 • 1749-016 Lisboa
Tel. e Fax.: 217500439 E-mail: info@speco.pt
<http://speco.pt>

2018, 13-15 June

24th International Sustainable Development
Research Society Conference ACTION FOR A
SUSTAINABLE WORLD: FROM THEORY TO
PRACTICE

<https://isdrs2018.exordo.com>

Dear Flavia,

Thank you for your submission to ISDRS 2018.

Following review by the Programme Committee, I am pleased to inform you that your submission entitled '**E2 and EE2 removal from wastewater using Peracetic Acid**' has been accepted for **Poster presentation** at the conference - congratulations.

You will find comments from the reviewers by logging in to your [ISDRS 2018 Dashboard](#) and clicking on the 'View All Decisions' prompt from your card. Please take these comments into account when preparing the final camera-ready version of your paper.

Please note that limited variations, between oral or poster presentations, may be made depending on the revision that you will do on your abstract (especially if major revisions are required) and depending on the conference needs.

Full details about how to submit your final paper and how to register for the conference will be circulated in a separate e-mail.

The deadline for the submission of the revised abstracts or full papers (you can choose to publish an abstract or a full paper in the proceedings) is **March 12, 2018**.

If you submit a full paper, it will be submitted to a double blind review process before its acceptance.

Again, congratulations on your acceptance. We look forward to meeting you at ISDRS 2018!

Yours Sincerely,

Roberta Salomone,

ISDRS 2018

Anexo IV - Ficha de Segurança do composto EE2

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

Versão 5.2 Data de revisão 13.11.2012

Data de impressão 06.07.2017

1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/MISTURA E DA SOCIEDADE/EMPRESA

1.1 Identificadores do produto

Nome do produto : 17A-ETINILESTRADIOL

Referência do Produto : E4876
Marca : Sigma
No. CAS : 57-63-6

1.2 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Utilizações identificadas : Produtos químicos de laboratório, Fabrico de substâncias

1.3 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Companhia : Sigma-Aldrich Química, S.L.
Sucursal em Portugal
Caixa Postal 131
Av. Almirante Gago Coutinho,
132-134,
P-2711 901 SINTRA

Telefone : +351219242555
Número de Fax : +351219242610
Email endereço : eurtechserv@sial.com

1.4 Número de telefone de emergência

Número de Telefone de Emergência : +(351)-308801773 (CHEMTREC)

2. IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS

2.1 Classificação da substância ou mistura

Classificação de acordo com el Regulamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Toxicidade aguda, Oral (Categoria 4)

Carcinogenicidade (Categoria 1B)

Classificação de acordo com as Directivas da EU 67/548/CEE ou 1999/45/CE

Pode causar cancro. Nocivo por ingestão.

2.2 Elementos da etiqueta

Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Pictograma



Palavra-sinal : Perigo

Declaração de perigo

H302

H350

Nocivo por ingestão.
Pode provocar cancro.

declaração de precaução

P201

P308 + P313

Pedir instruções específicas antes da utilização.
EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

Declarações de Perigo

Adicionais

nenhum(a)

Reservado aos utilizadores profissionais.

De acordo com a directiva Europeia 67/548/CEE, e emendas.

símbolo de perigosidade



Frase(s) - R

R45

Pode causar cancro.

R22

Também nocivo por ingestão.

Frase(s) - S

S53

Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização.

S45

Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

S36/37/39

Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados.

Reservado aos utilizadores profissionais.

2.3 Outros Perigos - nenhum(a)

3. COMPOSIÇÃO/ INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES

3.1 Substâncias

Sinónimos

: 17 α -Ethinyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol
19-Nor-1,3,5(10),17 α -pregnatrien-20-yne-3,17-diol
Ethinylestradiol

Formula

: C₂₀H₂₄O₂

Peso molecular

: 296,40 g/mol

Componente	Concentração
17α-Ethinylestradiol	
No. CAS	57-63-6
No. CE	200-342-2

4. PRIMEIROS SOCORROS

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Se for inalado

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico.

No caso dum contacto com a pele

Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

No caso dum contacto com os olhos

Lavar os olhos com água como precaução.

Se for engolid

Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

4.3 Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários dados não disponíveis

5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIOS

5.1 Meios de extinção

Meios adequados de extinção

Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

5.2 Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura

Óxidos de carbono

5.3 Recomendações para o pessoal de combate a incêndios

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

5.4 Outras informações

dados não disponíveis

6. MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS

6.1 Precauções individuais, equipamento de protecção e procedimentos de emergência

Usar equipamento de protecção individual. Evitar a formação de poeira. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Evacuar o pessoal para áreas de segurança. Evitar de respirar o pó.

6.2 Precauções a nível ambiental

Prevenir dispersão ou derramamento ulterior se for mais seguro assim. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos. A descarga no meio ambiente deve ser evitada.

6.3 Métodos e materiais de confinamento e limpeza

Apanhar os resíduos sem levantar poeiras. Varrer e apanhar com uma pá. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.

6.4 Remissão para outras secções

Para eliminação de resíduos ver secção 13.

7. MANUSEAMENTO E ARMAZENAGEM

7.1 Precauções para um manuseamento seguro

Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a formação de pó e aerossóis. Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização. Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Medidas usuais de protecção preventiva contra incêndio.

7.2 Condições de armazenagem segura, incluindo eventuais incompatibilidades

Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.

Sensível à luz.

7.3 Utilizações finais específicas

dados não disponíveis

8. CONTROLO DA EXPOSIÇÃO/ PROTECÇÃO INDIVIDUAL

8.1 Parâmetros de controlo

Componentes a controlar com relação ao local de trabalho

Não contem substâncias com valores limites de exposição profissional.

8.2 Controlo da exposição

Controlos técnicos adequados

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho.

Protecção individual

Protecção ocular/ facial

Óculos de protecção com um lado protector de acordo com EN 166 Use equipamento de protecção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, tais como NIOSH (US) ou EN 166 (EU).

Protecção da pele

Manusear com luvas. As luvas devem ser inspectadas antes da utilização. Use uma técnica adequada para a remoção das luvas (sem tocar a superfície exterior da luva) para evitar o contacto da pele com o produto. Descarte as luvas contaminadas após o uso, em conformidade com as leis e boas práticas de laboratório. Lavar e secar as mãos.

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Protecção do corpo

Fato completo de protecção para produtos químicos. O género de equipamento de protecção deve ser escolhido de acordo com a concentração e a quantidade da substância perigosa no lugar de trabalho.

Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de partículas do tipo N100 (E.U.A.) ou cartuchos de respiração do tipo P2 (EN 143) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, use um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS**9.1 Informações sobre propriedades físicas e químicas de base**

a) Aspecto	Forma: sólido
b) Odor	dados não disponíveis
c) Limiar olfativo	dados não disponíveis
d) pH	dados não disponíveis
e) Ponto de fusão/ponto de congelação	Ponto/intervalo de fusão: 182 - 183 °C - lit.
f) Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	dados não disponíveis
g) Ponto de inflamação	não aplicável dados não disponíveis
h) Taxa de evaporação	dados não disponíveis
i) Inflamabilidade (sólido, gás)	dados não disponíveis
j) limites de inflamabilidade superior / inferior ou explosivos	dados não disponíveis
k) Pressão de vapor	dados não disponíveis
l) Densidade de vapor	dados não disponíveis
m) Densidade relativa	dados não disponíveis
n) Hidrossolubilidade	dados não disponíveis
o) Coeficiente de partição n-octanol/água	dados não disponíveis
p) Temperatura de auto-ignição	dados não disponíveis
q) Temperatura de decomposição	dados não disponíveis
r) Viscosidade	dados não disponíveis
s) Propriedades explosivas	dados não disponíveis

- t) Propriedades combustíveis dados não disponíveis

9.2 Outra informação de segurança
dados não disponíveis

10. ESTABILIDADE E REACTIVIDADE

10.1 Reactividade
dados não disponíveis

10.2 Estabilidade química
dados não disponíveis

10.3 Possibilidade de reacções perigosas
dados não disponíveis

10.4 Condições a evitar
dados não disponíveis

10.5 Materiais incompatíveis
Agentes oxidantes fortes

10.6 Produtos de decomposição perigosos
Outros produtos de decomposição perigosos - dados não disponíveis

11. INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA

11.1 Informações sobre os efeitos toxicológicos

Toxicidade aguda
DL50 Oral - ratazana - 960 mg/kg

Corrosão/irritação cutânea
dados não disponíveis

Lesões oculares graves/irritação ocular
dados não disponíveis

Sensibilização respiratória ou cutânea
dados não disponíveis

Mutagenicidade em células germinativas
dados não disponíveis

Carcinogenicidade

Há provas suficientes da carcinogenicidade do etinilestradiol em animais experimentais. Na ausência de dados adequados em seres humanos, é razoável, para fins práticos, que se considere o etinilestradiol como se apresentasse um risco carcinogénico para os seres humanos. Os estudos em seres humanos sugerem vivamente que a administração de estrogénios está casualmente relacionada com uma incidência aumentada de carcinoma endometrial; não há provas de que o etinilestradiol seja diferente de outros estrogénios a este respeito.

Carcinogénio humano possível

IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.

Toxicidade reprodutiva
As experiências no laboratório mostraram efeitos teratogénicos

Tendo em base experimentos com animais de laboratório, a exposição excessiva pode provocar desordem(ns) reprodutiva(s).

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única
dados não disponíveis

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida
dados não disponíveis

Perigo de aspiração
dados não disponíveis

Efeitos potenciais para a saúde

Inalação	Pode ser perigoso se for inalação. Pode causar uma irritação do aparelho respiratório.
Ingestão	Nocivo por ingestão.
Pele	Pode ser perigoso se for absorção pela pele. Pode causar uma irritação da pele.
Olhos	Pode causar uma irritação dos olhos.

Informação adicional
RTECS: RC8925000

12. INFORMAÇÃO ECOLÓGICA

12.1 Toxicidade

12.2 Persistência e degradabilidade
dados não disponíveis

12.3 Potencial de bioacumulação
dados não disponíveis

12.4 Mobilidade no solo
dados não disponíveis

12.5 Resultados da avaliação PBT e mPmB
dados não disponíveis

12.6 Outros efeitos adversos
Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
dados não disponíveis

13. CONSIDERAÇÕES RELATIVAS À ELIMINAÇÃO

13.1 Métodos de tratamento de resíduos

Produto

Propor a entrega de soluções excedentes e não recicláveis a uma empresa idônea de tratamento de resíduos. Entrar em contato com um serviço profissional credenciado de descarte de lixo para descartar esse material. Dissolver ou misturar o material com um solvente combustível e queimar em incinerador químico equipado com pós-combustor e purificador de gases.

Embalagens contaminadas

Eliminar como produto Não utilizado.

14. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO TRANSPORTE

14.1 Número ONU

ADR/RID: 3077 IMDG: 3077 IATA: 3077

14.2 Designação oficial de transporte da ONU

ADR/RID: MATÉRIA PERIGOSA DO PONTO DE VISTA DO AMBIENTE, SÓLIDA, N.S.A. (17α-Ethynylestradiol)

IMDG: ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, SOLID, N.O.S. (17α-Ethynylestradiol)

IATA: Environmentally hazardous substance, solid, n.o.s. (17α-Ethynylestradiol)

14.3 Classes de perigo para efeitos de transporte

ADR/RID: 9 IMDG: 9 IATA: 9

14.4 Grupo de embalagem

ADR/RID: III IMDG: III IATA: III

14.5 Perigos para o ambiente

ADR/RID: sim

IMDG Marine pollutant: yes

IATA: yes

14.6 Precauções especiais para o utilizador

Outras informações

Marca-EHS requerida (códigos ADR 2.2.9.1.10 e IMDG 2.10.3) para embalagens únicas e embalagens combinadas que contenham embalagens interiores com Mercadorias Perigosas > 5L para líquidos ou > 5Kg para sólidos.

15. INFORMAÇÃO SOBRE REGULAMENTAÇÃO

Esta folha de dados de segurança obedece aos requerimentos da Regulamento (CE) No. 1907/2006

15.1 Regulamentação/legislação específica para a substância ou mistura em matéria de saúde, segurança e ambiente

dados não disponíveis

15.2 Avaliação da segurança química

dados não disponíveis

16. OUTRAS INFORMAÇÕES

Outras informações

Direitos exclusivos, 2012, da Sigma-Aldrich Co. LLC. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam correctas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A informação contida neste documento esta baseada no presente estado do nosso conhecimento e é aplicável às precauções de segurança apropriadas para o produto. Não representa nenhuma garantia das propriedades do produto. A Corporação Sigma-Aldrich e as suas companhias afiliadas, não responderão por nenhum dano resultante do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar www.sigma-aldrich.com e/ou o verso da factura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo V - Ficha de Segurança do Ácido Peracético



SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Revision Date 18.06.2013

Version 8.0

SECTION 1. Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

1.1 Product identifier

Catalogue No.	107222
Product name	Peracetic acid about 38-40%
REACH Registration Number	This product is a mixture. REACH Registration Number see section 3.

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Identified uses	Reagent for analysis, Chemical production For additional information on uses please refer to the Merck Chemicals portal (www.merck-chemicals.com).
-----------------	--

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

Company	Merck KGaA * 64271 Darmstadt * Germany * Phone: +49 6151 72-0
Responsible Department	LS-QHC * e-mail: prodsafe@merckgroup.com

1.4 Emergency telephone number

Please contact the regional company representation in your country.

SECTION 2. Hazards identification

2.1 Classification of the substance or mixture

Classification (REGULATION (EC) No 1272/2008)

Self reactive substances, Type D, H242
Acute toxicity, Category 3, Oral, H301
Skin corrosion, Category 1A, H314
Acute aquatic toxicity, Category 1, H400
For the full text of the H-Statements mentioned in this Section, see Section 16.

Classification (67/548/EEC or 1999/45/EC)

O	Oxidising	R7
C	Corrosive	R35
Xn	Harmful	R20/21/22
N	Dangerous for the environment	R50

For the full text of the R-phrases mentioned in this Section, see Section 16.

2.2 Label elements

Labelling (REGULATION (EC) No 1272/2008)

Hazard pictograms



Signal word
Danger

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Hazard statements

H242 Heating may cause a fire.
H301 Toxic if swallowed.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.
H335 May cause respiratory irritation.
H400 Very toxic to aquatic life.

Precautionary statements

Prevention

P210 Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. - No smoking.
P273 Avoid release to the environment.
P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

Response

P301 + P330 + P331 IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309 + P310 IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.
P370 + P378 In case of fire: Use sand for extinction.

Reduced labelling (≤125 ml)

Hazard pictograms



Signal word

Danger

Hazard statements

H301 Toxic if swallowed.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.

Precautionary statements

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P301 + P330 + P331 IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309 + P310 IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.
P370 + P378 In case of fire: Use sand for extinction.

Contains: acetic acid, Peracetic acid

Labelling (67/548/EEC or 1999/45/EC)

<i>Symbol(s)</i>	O C N	Oxidising Corrosive Dangerous for the environment
<i>R-phrases(s)</i>	7-20/21/22-35-50	May cause fire. Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed. Causes severe burns. Very toxic to aquatic organisms.
<i>S-phrases(s)</i>	3/7-26-36/37/39-45-61-14	Keep container tightly closed in a cool place. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible). Avoid release to the environment. Refer to special instructions/ Safety data sheets. Keep away from

The Safety Data Sheets for catalogue items are available at www.merckgroup.com

Page 2 of 15

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Reduced labelling (≤125 ml)

Symbol(s)  O
 C
 N

R-phrases(s) 20/21/22-35

S-phrases(s) 3/7-26-36/37/39-45

flammable organic substances.

Oxidising
Corrosive
Dangerous for the environment
Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed. Causes severe burns.
Keep container tightly closed in a cool place. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Contains: acetic acid, Peracetic acid

2.3 Other hazards
None known.

SECTION 3. Composition/information on ingredients

Chemical nature Mixture of inorganic and organic compounds

3.1 Substance
not applicable

3.2 Mixture

Hazardous components (REGULATION (EC) No 1272/2008)

Chemical Name (Concentration)

CAS-No. Registration number Classification

acetic acid ($\geq 25\%$ - $< 50\%$)

Substance does not meet the criteria for PBT or vPvB according to Regulation (EC) No 1907/2006, Annex XIII.

64-19-7	01-2119475328-30-XXXX	Flammable liquid, Category 3, H226 Skin corrosion, Category 1A, H314
---------	-----------------------	---

Peracetic acid ($\geq 25\%$ - $< 50\%$)

79-21-0	*)	Flammable liquid, Category 3, H226 Organic peroxide, Type D, H242 Acute toxicity, Category 4, H332 Acute toxicity, Category 4, H312 Acute toxicity, Category 4, H302 Skin corrosion, Category 1A, H314 Acute aquatic toxicity, Category 1, H400
---------	----	---

hydrogen peroxide ($\geq 1\%$ - $< 5\%$)

Substance does not meet the criteria for PBT or vPvB according to Regulation (EC) No 1907/2006, Annex XIII.

7722-84-1	01-2119485845-22-XXXX	Oxidising liquid, Category 1, H271 Acute toxicity, Category 4, H332 Acute toxicity, Category 4, H302 Skin corrosion, Category 1A, H314
-----------	-----------------------	---

*) A registration number is not available for this substance as the substance or its use are exempted from registration according to Article 2 REACH Regulation (EC) No 1907/2006, the annual tonnage does not require a registration or the registration is envisaged for a later registration deadline.

For the full text of the H-Statements mentioned in this Section, see Section 16.

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Hazardous components (1999/45/EC)

Chemical Name (Concentration)

CAS-No. Classification

acetic acid ($\geq 25\%$ - $< 50\%$)

64-19-7 R10
C, Corrosive; R35

Peracetic acid ($\geq 25\%$ - $< 50\%$)

79-21-0 O, Oxidising; R7
R10
Xn, Harmful; R20/21/22
C, Corrosive; R35
N, Dangerous for the environment; R50

hydrogen peroxide ($\geq 1\%$ - $< 5\%$)

7722-84-1 R5
O, Oxidising; R8
Xn, Harmful; R20/22
C, Corrosive; R35

For the full text of the R-phrases mentioned in this Section, see Section 16.

SECTION 4. First aid measures

4.1 Description of first aid measures

General advice

First aider needs to protect himself.

After inhalation: fresh air. Call in physician.

After skin contact: wash off with plenty of water. Immediately remove contaminated clothing. If available swab with polyethylene glycol 400. Call a physician immediately.

After eye contact: rinse out with plenty of water. Immediately call in ophthalmologist.

After swallowing: make victim drink water (two glasses at most), avoid vomiting (risk of perforation). Call a physician immediately. Do not attempt to neutralise.

4.2 Most important symptoms and effects, both acute and delayed

Irritation and corrosion, Cough, Shortness of breath

4.3 Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

No information available.

SECTION 5. Firefighting measures

5.1 Extinguishing media

Suitable extinguishing media

Water, Carbon dioxide (CO₂), Foam, Dry powder

Unsuitable extinguishing media

For this substance/mixture no limitations of extinguishing agents are given.

5.2 Special hazards arising from the substance or mixture

Combustible.

Fire-promoting. Keep away from combustible materials.

Vapours are heavier than air and may spread along floors.

In the event of decomposition: danger of explosion!

The Safety Data Sheets for catalogue items are available at www.merckgroup.com

Page 4 of 15

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Forms explosive mixtures with air at elevated temperatures.
Development of hazardous combustion gases or vapours possible in the event of fire.

5.3 Advice for firefighters

Special protective equipment for firefighters

Stay in danger area only with self-contained breathing apparatus. Prevent skin contact by keeping a safe distance or by wearing suitable protective clothing.

Further information

Cool closed containers exposed to fire with water spray. Suppress (knock down) gases/vapours/mists with a water spray jet. Prevent fire extinguishing water from contaminating surface water or the ground water system.

SECTION 6. Accidental release measures

6.1 Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Advice for non-emergency personnel: Avoid substance contact. Do not breathe vapours, aerosols. Ensure adequate ventilation. Evacuate the danger area, observe emergency procedures, consult an expert.

Advice for emergency responders: Protective equipment see section 8.

6.2 Environmental precautions

Do not empty into drains.

6.3 Methods and materials for containment and cleaning up

Cover drains. Collect, bind, and pump off spills.

Observe possible material restrictions (see sections 7 and 10).

Take up with liquid-absorbent and neutralising material (e.g. Chemisorb® H⁺, Merck Art. No. 101595). Dispose of properly. Clean up affected area.

6.4 Reference to other sections

Indications about waste treatment see section 13.

SECTION 7. Handling and storage

7.1 Precautions for safe handling

Advice on safe handling

Observe label precautions.

Hygiene measures

Immediately change contaminated clothing. Apply preventive skin protection. Wash hands and face after working with substance.

7.2 Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Storage conditions

Tightly closed. Separately or together with other organic peroxides only and away from sources of ignition and heat.

Store at +15°C to +25°C.

7.3 Specific end use(s)

Apart from the uses mentioned in section 1.2 no other specific uses are stipulated.

SECTION 8. Exposure controls/personal protection

8.1 Control parameters

The Safety Data Sheets for catalogue items are available at www.merckgroup.com

Page 5 of 15

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Derived No Effect Level (DNEL)

acetic acid (64-19-7)

Worker DNEL, acute	Local effects	inhalation	25 mg/m³
Worker DNEL, longterm	Local effects	inhalation	25 mg/m³
Consumer DNEL, acute	Local effects	inhalation	25 mg/m³
Consumer DNEL, longterm	Local effects	inhalation	25 mg/m³

hydrogen peroxide (7722-84-1)

Worker DNEL, acute	Local effects	inhalation	3 mg/m³
Worker DNEL, longterm	Local effects	inhalation	1,4 mg/m³
Consumer DNEL, acute	Local effects	inhalation	1,93 mg/m³
Consumer DNEL, longterm	Local effects	inhalation	0,21 mg/m³

Predicted No Effect Concentration (PNEC)

acetic acid (64-19-7)

PNEC Fresh water	3,058 mg/l
PNEC Fresh water sediment	11,36 mg/kg
PNEC Marine water	0,3058 mg/l
PNEC Marine sediment	1,136 mg/kg
PNEC Aquatic intermittent release	30,58 mg/l
PNEC Sewage treatment plant	85 mg/l

hydrogen peroxide (7722-84-1)

PNEC Fresh water	0,0126 mg/l
PNEC Marine water	0,0126 mg/l
PNEC Aquatic intermittent release	0,0138 mg/l
PNEC Sewage treatment plant	4,66 mg/l
PNEC Fresh water sediment	0,47 mg/kg
PNEC Marine sediment	0,47 mg/kg
PNEC Soil	0,0023 mg/kg

8.2 Exposure controls

Engineering measures

Technical measures and appropriate working operations should be given priority over the use of personal protective equipment.

See section 7.1.

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Individual protection measures

Protective clothing needs to be selected specifically for the workplace, depending on concentrations and quantities of the hazardous substances handled. The chemical resistance of the protective equipment should be enquired at the respective supplier.

Eye/face protection

Tightly fitting safety goggles

Hand protection

full contact:

Glove material:	polychloroprene
Glove thickness:	0,65 mm
Break through time:	> 480 min

splash contact:

Glove material:	natural latex
Glove thickness:	0,6 mm
Break through time:	> 30 min

The protective gloves to be used must comply with the specifications of EC Directive 89/686/EEC and the related standard EN374, for example KCL 720 Camapren® (full contact), KCL 706 Lapren® (splash contact).

The breakthrough times stated above were determined by KCL in laboratory tests acc. to EN374 with samples of the recommended glove types.

This recommendation applies only to the product stated in the safety data sheet(>,<)> supplied by us and for the designated use. When dissolving in or mixing with other substances and under conditions deviating from those stated in EN374 please contact the supplier of CE-approved gloves (e.g. KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Internet: www.kcl.de).

Other protective equipment

protective clothing

Respiratory protection

required when vapours/aerosols are generated.

Recommended Filter type: filter ABEK

The entrepreneur has to ensure that maintenance, cleaning and testing of respiratory protective devices are carried out according to the instructions of the producer. These measures have to be properly documented.

Environmental exposure controls

Do not empty into drains.

SECTION 9. Physical and chemical properties

9.1 Information on basic physical and chemical properties

Form	liquid
Colour	colourless
Odour	stinging
Odour Threshold	No information available.
pH	ca. 1 at 20 °C

The Safety Data Sheets for catalogue items are available at www.merckgroup.com

Page 7 of 15

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Melting point	ca. -37 °C
Boiling point/boiling range	not applicable
Flash point	62 °C
Evapouration rate	No information available.
Flammability (solid, gas)	No information available.
Lower explosion limit	No information available.
Upper explosion limit	No information available.
Vapour pressure	ca.14 hPa at 20 °C
Relative vapour density	No information available.
Relative density	ca.1,14 g/cm ³ at 20 °C
Water solubility	at 20 °C soluble
Partition coefficient: n-octanol/water	No information available.
Auto-ignition temperature	No information available.
Decomposition temperature	> 60 °C
	Type D
Viscosity, dynamic	No information available.
Explosive properties	Not classified as explosive.
Oxidizing properties	No information available.
9.2 Other data	
Ignition temperature	225 °C Method: DIN 51794

SECTION 10. Stability and reactivity

10.1 Reactivity

Vapour/air-mixtures are explosive at intense warming.
A range from approx. 15 Kelvin below the flash point is to be rated as critical.

10.2 Chemical stability

stabilised
In case of decomposition in closed containers and tubes risk of bursting due to buildup of overpressure.

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

10.3 Possibility of hazardous reactions

Risk of explosion with:

Heavy metal salts, Reducing agents, Organic Substances, Amines, combustible substances, Acetic anhydride, Strong oxidizing agents, Peroxides, potassium permanganate, perchloric acid, phosphorus halides, Alkali metals, alkali salts, Alkaline earth metals, Metals, metallic oxides, metallic salts, nonmetals, nonmetallic oxides, Aldehydes, Ammonia, hydrazine and derivatives, hydrides, Ether, anhydrides, alkenes, organic nitro compounds, brass, Impurities

Exothermic reaction with:

Ether, alkalines, mineral acids, Nitric acid, Alcohols, chromosulfuric acid, halogen-halogen compounds, chlorosulfonic acid, Tetrahydrofuran

metallic chlorides, with, Water

Risk of ignition or formation of inflammable gases or vapours with:

solvent, Hydrocarbons, fuming sulfuric acid

10.4 Conditions to avoid

Heating (explosive decomposition).

10.5 Incompatible materials

no information available

10.6 Hazardous decomposition products

no information available

SECTION 11. Toxicological information

11.1 Information on toxicological effects

Mixture

Acute oral toxicity

LD50 rat: 263 mg/kg (External MSDS)

Symptoms: If ingested, severe burns of the mouth and throat, as well as a danger of perforation of the oesophagus and the stomach.

Risk of aspiration upon vomiting.

Acute inhalation toxicity

Symptoms: burns of mucous membranes, Cough, Shortness of breath, Inhalation may lead to the formation of oedemas in the respiratory tract.

Acute toxicity estimate: > 20 mg/l; 4 h ; vapour

Calculation method

Acute dermal toxicity

absorption

Acute toxicity estimate : > 2.000 mg/kg

Calculation method

Skin irritation

Mixture causes severe burns.

Eye irritation

Mixture causes serious eye damage.

Risk of blindness!

Sensitisation

This information is not available.

Germ cell mutagenicity

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Genotoxicity in vitro

Mutagenicity (mammal cell test): chromosome aberration.

Result: negative

Method: OECD Test Guideline 473

Carcinogenicity

This information is not available.

Reproductive toxicity

This information is not available.

Teratogenicity

This information is not available.

Specific target organ toxicity - single exposure

Mixture may cause respiratory irritation.

Specific target organ toxicity - repeated exposure

This information is not available.

Aspiration hazard

This information is not available.

11.2 Further information

Absorption can result in damage to:

Kidney, Changes in the blood count

Other dangerous properties can not be excluded.

Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

Components

acetic acid

Acute oral toxicity

LD50 rat: 3.310 mg/kg (RTECS)

Acute inhalation toxicity

LCLO rat: 39,95 mg/l; 4 h (RTECS)

LC50 rat: 11,4 mg/l; 4 h (IUCLID)

Acute dermal toxicity

LD50 rabbit: 1.060 mg/kg (IUCLID)

Skin irritation

rabbit

Result: Causes burns.

(IUCLID)

Germ cell mutagenicity

Genotoxicity in vitro

Ames test

Salmonella typhimurium

Result: negative

(National Toxicology Program)

Teratogenicity

Did not show teratogenic effects in animal experiments. (IUCLID)

Peracetic acid

Acute oral toxicity

Acute toxicity estimate: 500,1 mg/kg

Expert judgement

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Acute inhalation toxicity
Acute toxicity estimate: 11,1 mg/l; vapour
Expert judgement

Acute dermal toxicity
Acute toxicity estimate : 1.100,1 mg/kg
Expert judgement

hydrogen peroxide
Acute oral toxicity
Acute toxicity estimate: 500,1 mg/kg
Expert judgement

Acute inhalation toxicity
Acute toxicity estimate: 11,1 mg/l; vapour
Expert judgement

SECTION 12. Ecological information

Mixture

12.1 Toxicity

No information available.

12.2 Persistence and degradability

Biodegradability

Readily biodegradable.

12.3 Bioaccumulative potential

No information available.

12.4 Mobility in soil

No information available.

12.5 Results of PBT and vPvB assessment

PBT/vPvB assessment not available as chemical safety assessment not required/not conducted.

12.6 Other adverse effects

Additional ecological information

Biological effects:

Bactericidal effect.

Fungicide

Further information on ecology

Discharge into the environment must be avoided.

Components

acetic acid

Toxicity to fish
LC50 *Lepomis macrochirus* (Bluegill sunfish): 75 mg/l; 96 h (Lit.)

Toxicity to daphnia and other aquatic invertebrates
EC50 *E. sulcatum*: 78 mg/l; 72 h neutral (maximum permissible toxic concentration) (Lit.)

EC50 *Daphnia magna* (Water flea): 47 mg/l; 24 h (Lit.)

Toxicity to algae
IC50 *Scenedesmus quadricauda* (Green algae): 4.000 mg/l; 16 h (maximum permissible toxic concentration) (Lit.)

Toxicity to bacteria
EC50 *Pseudomonas putida*: 2.850 mg/l; 16 h neutral (maximum permissible toxic concentration) (Lit.)

EC50 *Photobacterium phosphoreum*: 11 mg/l; 15 min microtox test (IUCLID)

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Biodegradability

99 %; 30 d
OECD Test Guideline 301D
(HSDB)
Readily biodegradable.

95 %; 5 d
OECD Test Guideline 302B
Readily eliminated from water

Biochemical Oxygen Demand (BOD)
880 mg/g (5 d)
(Lit.)

Ratio BOD/ThBOD
BOD5 76 %
(IUCILD)

Substance does not meet the criteria for PBT or vPvB according to Regulation (EC) No 1907/2006, Annex XIII.

Peracetic acid

No information available.

hydrogen peroxide

Toxicity to fish
LC50 *Pimephales promelas* (fathead minnow): 16,4 mg/l; 96 h (IUCILD)

Toxicity to daphnia and other aquatic invertebrates
EC50 *Daphnia magna* (Water flea): 2,3 mg/l; 48 h (ECOTOX Database)

NOEC *Daphnia magna* (Water flea): 0,63 mg/l; 21 d (External MSDS)

Toxicity to algae
IC50 *Pseudokirchneriella subcapitata* (green algae): 5,7 mg/l; 72 h (ECOTOX Database)

Growth rate NOEC *Skeletonema costatum*: 0,63 mg/l; 72 h (External MSDS)

Toxicity to bacteria
static test EC50 activated sludge: 466 mg/l; 30 min
OECD Test Guideline 209

static test EC50 activated sludge: > 1.000 mg/l; 3 h
OECD Test Guideline 209

Biodegradability

Readily biodegradable.

Substance does not meet the criteria for PBT or vPvB according to Regulation (EC) No 1907/2006, Annex XIII.

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

SECTION 13. Disposal considerations

Waste treatment methods

See www.retrologistik.com for processes regarding the return of chemicals and containers, or contact us there if you have further questions.

SECTION 14. Transport information

Land transport (ADR/RID)

14.1 UN number	UN 3105
14.2 Proper shipping name	ORGANIC PEROXIDE TYPE D, LIQUID (PEROXYACETIC ACID, TYPE D, STABILIZED)
14.3 Class	5.2 (8)
14.4 Packing group	
14.5 Environmentally hazardous	yes
14.6 Special precautions for user	yes
Tunnel restriction code	D

Inland waterway transport (ADN)

Not relevant

Air transport (IATA)

14.1 UN number	UN 3105
14.2 Proper shipping name	ORGANIC PEROXIDE TYPE D, LIQUID
14.3 Class	5.2 (8)
14.4 Packing group	
14.5 Environmentally hazardous	yes
14.6 Special precautions for user	yes Not permitted for transport

Sea transport (IMDG)

14.1 UN number	UN 3105
14.2 Proper shipping name	ORGANIC PEROXIDE TYPE D, LIQUID (PEROXYACETIC ACID, TYPE D, STABILIZED)
14.3 Class	5.2 (8)
14.4 Packing group	
14.5 Environmentally hazardous	yes
14.6 Special precautions for user	yes
EmS	F-J S-R

14.7 Transport in bulk according to Annex II of MARPOL 73/78 and the IBC Code
Not relevant

SECTION 15. Regulatory information

15.1 Safety, health and environmental regulations/legislation specific for the substance or mixture

EU regulations

The Safety Data Sheets for catalogue items are available at www.merckgroup.com

Page 13 of 15

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

Major Accident Hazard Legislation	96/82/EC Oxidising 3 Quantity 1: 50 t Quantity 2: 200 t
	96/82/EC Dangerous for the environment 9a Quantity 1: 100 t Quantity 2: 200 t
Occupational restrictions	Take note of Dir 94/33/EC on the protection of young people at work. Take note of Dir 92/85/EEC on the safety and health at work of pregnant workers.
Regulation (EC) No 1005/2009 on substances that deplete the ozone layer	not regulated
Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on persistent organic pollutants and amending Directive 79/117/EEC	not regulated
Regulation (EC) No 689/2008 concerning the export and import of dangerous chemicals	not regulated
Substances of very high concern (SVHC)	This product does not contain substances of very high concern above the respective regulatory limit (> 0.1 % (w/w) Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), Article 57).
<i>National legislation</i>	
Storage class	5.2

15.2 Chemical Safety Assessment

For this product a chemical safety assessment was not carried out.

SAFETY DATA SHEET
according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Catalogue No. 107222
Product name Peracetic acid about 38-40%

SECTION 16. Other information

Full text of H-Statements referred to under sections 2 and 3.

H226	Flammable liquid and vapour.
H242	Heating may cause a fire.
H271	May cause fire or explosion; strong oxidiser.
H301	Toxic if swallowed.
H302	Harmful if swallowed.
H312	Harmful in contact with skin.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
H332	Harmful if inhaled.
H400	Very toxic to aquatic life.

Full text of R-phrases referred to under sections 2 and 3

R 5	Heating may cause an explosion.
R 7	May cause fire.
R 8	Contact with combustible material may cause fire.
R10	Flammable.
R20/21/22	Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R20/22	Harmful by inhalation and if swallowed.
R35	Causes severe burns.
R50	Very toxic to aquatic organisms.

Training advice

Provide adequate information, instruction and training for operators.

Key or legend to abbreviations and acronyms used in the safety data sheet

Used abbreviations and acronyms can be looked up at www.wikipedia.org.

Regional representation

This information is given on the authorised Safety Data Sheet for your country.

The information contained herein is based on the present state of our knowledge. It characterises the product with regard to the appropriate safety precautions. It does not represent a guarantee of any properties of the product.

Anexo VI - Determinação da Carência Química de Oxigênio (CQO)

O método utilizado para a determinação da CQO, baseia-se numa ebulição com refluxo aberto, descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Greenberg et al., 1985).

A. Reagentes

- **Ácido sulfúrico**, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 4 \text{ mol.L}^{-1}$.
- **Ácido sulfúrico-Sulfato de prata.**
- **Dicromato de potássio**, solução padrão de referência, $c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 0,040 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo um sal de mercúrio (II).
- **Sulfato de ferro (II) e amônio**, solução titulada, $c[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] \approx 0,12 \text{ mol.L}^{-1}$. Esta solução deve ser padronizada diariamente do seguinte modo:

Diluir 10,0 mL da solução padrão de referência de dicromato de potássio com cerca de 100 mL de ácido sulfúrico. Titular com a solução de sulfato de ferro (II) e amônio, na presença de 2 ou 3 gotas de indicador de ferroína.

A concentração, c , expressa em moles por litro, da solução de sulfato de ferro (II) e amônio é dada pela seguinte fórmula:

$$c = \frac{10,0 \times 0,04 \times 6}{V} = \frac{2,4}{V} \quad (17)$$

Onde V é o volume, em mililitros, da solução de sulfato de ferro (II) e amônio consumido na titulação.

- **Hidrogenoftalato de potássio**, solução padrão de referência, $c(\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4) = 2,0824 \text{ mmol.L}^{-1}$.
- **Ferroína**, solução indicadora.

B. Equipamento

- **Aparelho de refluxo**: constituído por um Erlenmeyer ou um tubo com gargalo esmerilhado ligado a um refrigerante de modo a evitar qualquer perda importante de matéria volátil.
- **Manta**: placa ou outro qualquer equipamento para aquecimento que permita levar a amostra à ebulição em menos de 10 minutos.
- **Bureta de precisão**: com 10 mL de capacidade, graduada em 0,02 mL.
- **Reguladores de ebulição**: Esferas de vidro rugosas, de 2 a 3 mm de diâmetro, ou outros reguladores de ebulição.
- **Material corrente de laboratório.**

C. Modo operativo

- Medir 10,0 mL de amostra (diluída se necessário) para um balão ou tubo do aparelho de refluxo e juntar $5,00 \text{ mL} \pm 0,01 \text{ mL}$ da solução de dicromato de potássio e alguns reguladores de ebulição. Agitar cuidadosamente.
- Juntar lentamente e com precaução 15 mL da mistura ácido sulfúrico-sulfato de prata e ligar imediatamente o balão ou tubo ao refrigerante.

- Levar a mistura reacional à ebulição em 10 minutos e continuar a ebulição durante mais 110 minutos. A temperatura da mistura reacional deve ser de $148^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Arrefecer o balão ou tubo imediatamente em água fria até cerca de 60°C , lavando simultaneamente o refrigerante com uma pequena quantidade de água. Retirar o refrigerante e diluir a mistura reacional a cerca de 75 mL. Arrefecer até à temperatura ambiente.
- Titular o excesso de dicromato com a solução de sulfato de ferro (II) e amónio, na presença de 1 ou 2 gotas da solução indicadora de ferroína.

D. Ensaio em branco

Efectuar em paralelo dois ensaios em branco com cada série de determinações seguindo o mesmo modo operativo apresentado anteriormente, mas substituindo a toma de amostra por 10,0 mL de água destilada.

E. Expressão dos resultados

A carência química de oxigénio, CQO, expressa em miligramas por litro, é dada pela seguinte fórmula:

$$CQO(\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{8000c(V_1 - V_2)}{V_0} \quad (18)$$

Onde:

c = concentração, em moles por litro, da solução de sulfato de ferro (II) e amónio;

V_0 = volume, em mililitros, da toma para ensaio antes da diluição (se a mesma ocorrer);

V_1 = volume, em mililitros, da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido no ensaio em branco;

V_2 = volume, em mililitros, da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumidos no ensaio com a amostra;

8000 = massa molar, em miligramas por litro, de $\frac{1}{2}$ de O_2 .

Anexo VII - Protocolo do Ensaio da Proteína Bradford

Para a determinação da concentração de proteína, inicialmente, é necessário proceder à preparação do reagente de Bradford. Como tal, deve-se:

1. Dissolver 50 mg de *Coomassie Blue G250* em 50 mL de metanol;
2. Adicionar 100 mL de H_3PO_4 a 85%;
3. Adicionar a solução preparada seguindo os passos anteriores a 500 mL de água e misturar;
4. Filtrar e precipitar;
5. Adicionar 350 mL de água;
6. Conservar a 4°C.

Após isto, deve-se proceder à preparação dos padrões de proteína BSA, com um volume de 0,5 mL, que irão permitir construir a curva de calibração inerente ao processo.

A concentração do BSA em stock é de 1 mg/mL, logo deve utilizar-se água para diluir os padrões, e proceder a uma diluição em série para obter as concentrações padrão de proteína apresentadas na Tabela 31.

Tabela 31 - Padrões BSA.

Concentração Proteína BSA Padrão (µg/mL)

2000	1000	500	250	125	62,5	31,25
------	------	-----	-----	-----	------	-------

Considerando o número de poços necessários e a duplicação de cada amostra, o preenchimento dos poços deverá contemplar 20 µL de padrão ou 20 µL de amostra, consoante o poço e ainda, 180 µL de solução de Bradford.

De seguida, determina-se as absorvâncias a 595 nm.

Nota: A solução de Bradford apresenta grande afinidade com as proteínas ligando-se às mesmas, após a adição da solução de Bradford o conteúdo dos poços irá corar de azul; quanto maior for a concentração de proteína mais intenso será o azul apresentado.

Anexo VIII - Curva de calibração (250 mL) e cromatogramas

Na Figura 34 é apresentada a curva de calibração realizada primeiramente concentrado 250 mL de amostra.

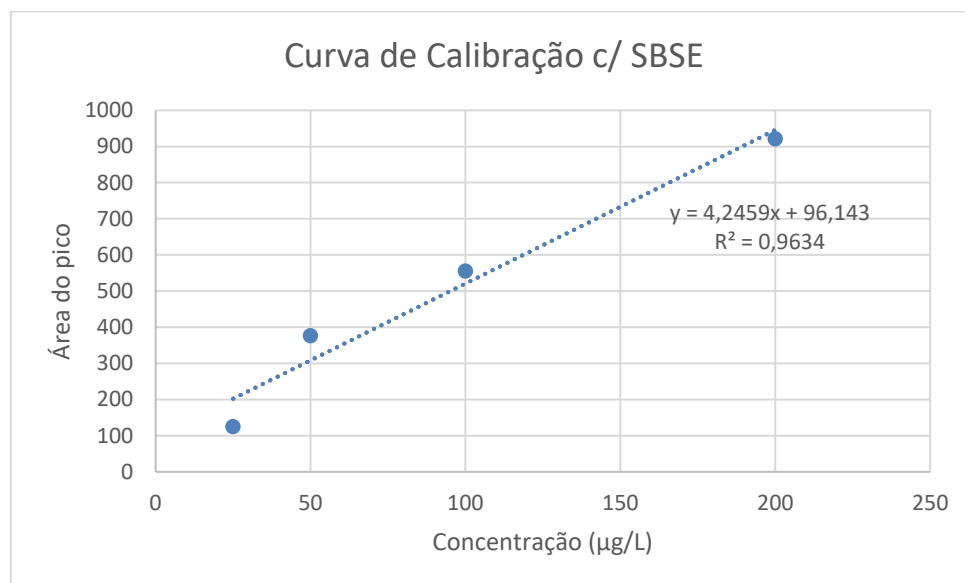


Figura 34 - Curva de calibração concentrando 250 mL.

Na

Figura 35, é apresentado o cromatograma referente à curva de calibração em 250 mL e uma concentração de 100 ppb de EE2.

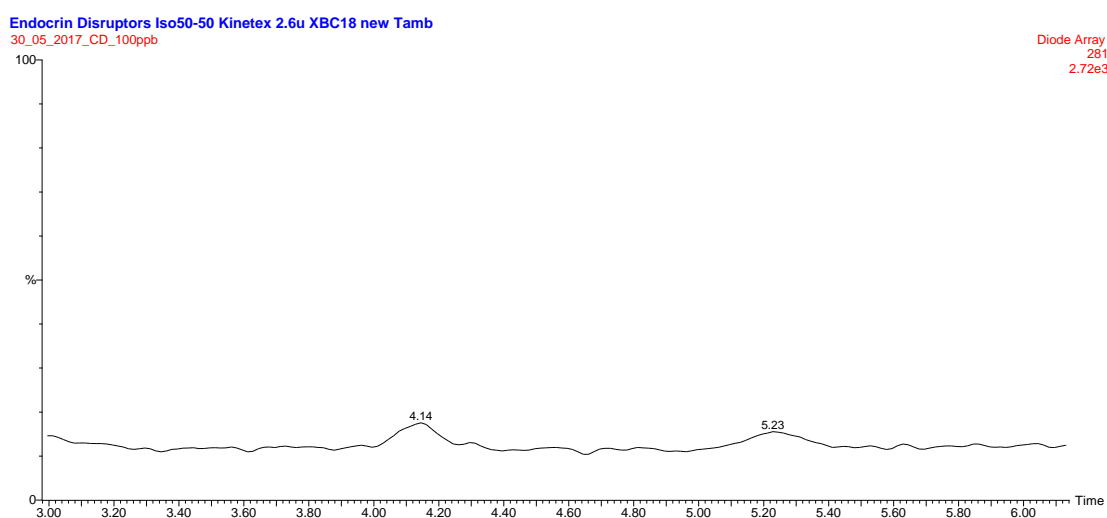


Figura 35 - Cromatograma referente à curva de calibração concentrando 250 mL ($\lambda=281$ nm).

Por sua vez, na Figura 36, é apresentado o cromatograma referente à curva de calibração, num litro e uma concentração de 100 ppb de EE2.

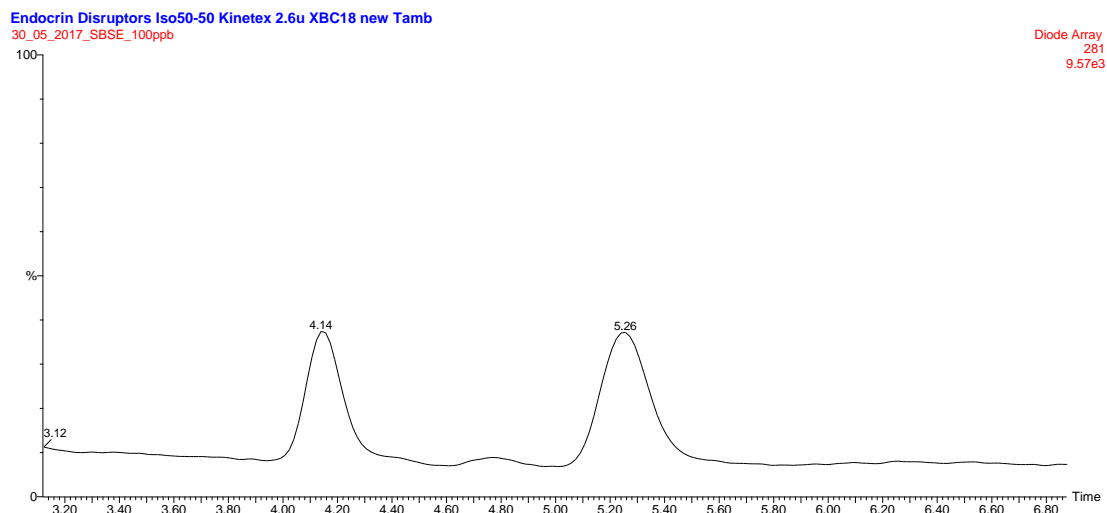


Figura 36 - Cromatograma referente à curva de calibração concentrando 1 L ($\lambda=281$ nm).

Da observação dos cromatogramas, é possível averiguar o que foi referido no ponto 6.2.3, o pico de EE2 obtido concentrando 1 L é mais visível e apresenta uma área superior, uma vez que estamos a concentrar 4 vezes mais, no entanto esta área irá corresponder a um valor de concentração na reta de calibração inferior.

Anexo IX - Ensaios ecotoxicológicos: tabelas de resultados GST

Tabela 32 - Teste estatístico do t-student para o GST.

Teste do t-student GST		
	Machos	Fêmeas
ControloM + EE2	0,01	0,18
ControloM + EE2 + PAA	0,03	0,11
ControloM + Cont. PAA	0,02	0,29
Controlo PAA + EE2 + PAA	0,10	0,34
Controlo H2O + EE2	0,62	0,07
Controlo H2O + EE2 + PAA	0,03	0,02
Controlo H2O + Cont. PAA	0,57	0,18
Controlo H2O + ControloM	0,002	0,04
EE2 + EE2 + PAA	0,29	0,57

Tabela 33 - Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para o GST.

		GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Género	Média		Desvio Padrão	
				M	F	M	F
Controlo (H2O)	C1	22,78	M	20,69	-	3,82	-
	C2	25,80	M				
	C3	20,87	M				
	C4	16,55	M				
	C5	17,43	M				
	C1	24,57	F	-	24,27	-	2,41
	C2	22,42	F				
	C3	28,45	F				
	C4	21,50	F				
	C5	23,89	F				
	C6	24,80	F				
H2O+MeOH	Controlo	124,28	M	143,30	170,63	56,36	148,68
	C1	98,92	M				
	C2	331,55	F				
	C3	206,71	M				
	C4	141,95	F				
	C5	38,38	F				
EE2	EE2 1	35,65	F	24,01	29,51	13,75	5,35
	EE2 2	27,03	F				
	EE2 3	17,75	M				
	EE2 4	20,86	M				
	EE2 a	44,10	M				
	EE2 b	25,86	F				
	EE2 c	13,32	M				
EE2+PAA	EE2+PAA 1	46,98	M	35,37	32,12	10,86	5,77
	EE2+PAA 2	40,55	F				
	EE2+PAA 3	30,14	F				
	EE2+PPA 4	25,46	M				
	EE2+PAA a	27,48	F				
	EE2+PAA b	33,66	M				
	EE2+PAA c	30,31	F				
H2O+PAA	PAA 1	22,72	M	22,09	27,29	1,20	2,52
	PAA 2	20,71	M				
	PAA 3	29,07	F				
	PAA a	22,85	M				
	PAA b	25,52	F				

Anexo X - Ensaios ecotoxicológicos: tabelas de resultados Catalase

Tabela 34 - Teste estatístico do t-student para a CAT.

Teste do t-student Catalase		
	Macho	Fêmea
ControloM + EE2	0,01	0,05
ControloM + EE2 + PAA	0,01	0,06
ControloM + Cont. PAA	0,10	0,001
Controlo PAA + EE2 + PAA	0,61	0,95
Controlo H2O + EE2	0,003	0,01
Controlo H2O + EE2 + PAA	0,004	0,01
Controlo H2O + Cont. PAA	0,04	6,12E-06
Controlo H2O + ControloM	0,08	0,10
EE2 + EE2 + PAA	0,90	0,81

Tabela 35 - Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para a CAT.

		CAT (nmol/min/μg)	Género	Média		Desvio Padrão	
				M	F	M	F
Controlo (H2O)	C1	14,88	M	11,82	-	2,45	-
	C2	12,67	M				
	C3	10,5	M				
	C4	8,42	M				
	C5	12,65	M				
	C1	15,5	F	-	14,26	-	2,71
	C2	10,64	F				
	C3	15,82	F				
	C4	17,88	F				
	C5	14,02	F				
	C6	11,7	F				
H2O+MeOH	Controlo	8,91	M	8,79	10,27	0,11	3,46
	C1	8,76	M				
	C2	6,34	F				
	C3	8,70	M				
	C4	12,87	F				
	C5	11,58	F				
EE2	EE2 1	24,14	F	28,25	41,15	7,64	18,69
	EE2 2	38,14	F				
	EE2 3	18,26	M				
	EE2 4	26,77	M				
	EE2 a	35,86	M				
	EE2 b	61,17	F				
	EE2 c	32,13	M				
EE2+PAA	EE2+PAA 1	33,44	M	29,06	45,56	8,22	24,29
	EE2+PAA 2	26,03	F				
	EE2+PAA 3	35,56	F				
	EE2+PPA 4	19,58	M				
	EE2+PAA a	39,67	F				
	EE2+PAA b	34,17	M				
	EE2+PAA c	80,96	F				
H2O+PAA	PAA 1	31,20	M	36,91	44,43	23,01	0,94
	PAA 2	17,30	M				
	PAA 3	45,09	F				
	PAA a	62,24	M				
	PAA b	43,76	F				

Anexo XI - Ensaios ecotoxicológicos: tabelas de resultados VTG

Tabela 36 - Teste estatístico do t-student para a VTG.

Teste t-student VTG		
	Macho	Fêmea
ControloM + EE2	-	0,01
ControloM + EE2 + PAA	-	0,003
ControloM + Cont. PAA	-	0,07
Controlo PAA + EE2 + PAA	-	0,001
Controlo H2O + EE2	-	0,001
Controlo H2O + EE2 + PAA	-	0,001
Controlo H2O + Cont. PAA	-	0,26
Controlo H2O + ControloM	-	0,05
EE2+ EE2 +PAA	-	0,04

Tabela 37 - Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para a VTG.

		VTG (Ug/mg Prot Total)	Gênero	Média		Desvio Padrão	
				M	F	M	F
Controlo (H2O)	C1	0	M	0,00	-	0,00	-
	C2	0,0005	M				
	C3	0,0001	M				
	C4	0	M				
	C5		M				
	C1	410,45	F	-	467,84	-	81,16
	C2	605,33	F				
	C3	425,7	F				
	C4	528,96	F				
	C5	405,67	F				
	C6	430,9	F				
H2O+MeOH	Controlo	229,76	F	0,00	322,83	0,00	106,24
	C1	438,58	F				
	C2	300,14	F				
	C3	-140,37	M				
	C4	-91,70	M				
	C5	-92,78	M				
EE2	EE2 1	2146,71	F	724,21	1829,75	196,25	611,90
	EE2 2	2218,14	F				
	EE2 b	1124,40	F				
	EE2 3	720,65	M				
	EE2 4	784,91	M				
	EE2 c	460,89	M				
	EE2 d	930,38	M				
EE2+PAA	EE2+PAA 1	-174,93	M	0,00	733,37	0,00	14,44
	EE2+PAA 4	-162,75	M				
	EE2+PAA b	-208,97	M				
	EE2+PPA c	725,40	F				
	EE2+PAA 3	724,66	F				
	EE2+PAA 2	750,03	F				
H2O+PAA	PAA 1	-226,06	M	0,00	543,42	0,00	22,50
	PAA 2	-137,94	M				
	PAA a	-122,30	M				
	PAA 3	559,34	F				
	PAA b	527,51	F				

Anexo XII - Ensaios ecotoxicológicos: tabelas de resultados Peroxidação Lipídica

Tabela 38 - Teste estatístico do t-student para a LPO.

Teste do t-student LPO		
	Macho	Fêmea
ControloM + EE2	0,92	0,28
ControloM + EE2 + PAA	0,82	0,47
ControloM + Cont. PAA	0,63	0,42
Controlo PAA + EE2 + PAA	0,65	0,62
Controlo H2O + EE2	0,01	0,01
Controlo H2O + EE2 + PAA	0,01	0,97
Controlo H2O + Cont. PAA	0,01	0,06
Controlo H2O + ControloM	0,12	0,33
EE2+ EE2+PAA	0,43	0,50

Tabela 39 - Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para a LPO.

		LPO (nmol/mg Prot total)	Género	Média		Desvio Padrão	
				M	F	M	F
Controlo (H2O)	C1	0,005	M	0,006	-	0,001	-
	C2	0,006	M				
	C3	0,0053	M				
	C4	0,007	M				
	C5	0,0074	M				
	C1	0,0055	F	-	0,007	-	0,001
	C2	0,008	F				
	C3	0,0064	F				
	C4	0,0056	F				
	C5	0,0075	F				
H2O+MeOH	Controlo	0,0071	M	0,0034	0,0111	0,0032	0,0099
	C1	0,0020	M				
	C2	0,0014	F				
	C3	0,0012	M				
	C4	0,0213	F				
	C5	0,0107	F				
EE2	EE2 1	0,0037	F	0,0036	0,0039	0,0009	0,0004
	EE2 2	0,0037	F				
	EE2 3	0,0033	M				
	EE2 4	0,0038	M				
	EE2 a	0,0047	M				
	EE2 b	0,0044	F				
	EE2 c	0,0025	M				
EE2+PAA	EE2+PAA 1	0,0039	M	0,0029	0,0065	0,0011	0,0060
	EE2+PAA 2	0,0143	F				
	EE2+PAA 3	0,0013	F				
	EE2+PPA 4	0,0017	M				
	EE2+PAA a	0,0023	F				
	EE2+PAA b	0,0031	M				
	EE2+PAA c	0,0081	F				
H2O+PAA	PAA 1	0,0042	M	0,0023	0,0041	0,0021	0,0017
	PAA 2	0,00005	M				
	PAA 3	0,0029	F				
	PAA a	0,0026	M				
	PAA b	0,0053	F				